

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 755**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/22</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/37</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/122</b>	(2006.01)
<b>A61K 36/47</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/16</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2010 PCT/AU2010/000152**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010 WO10091472**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2010 E 10740847 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2395993**

54 Título: **Tratamiento de la piel**

30 Prioridad:

**13.02.2009 US 152599 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.09.2017**

73 Titular/es:

**LEO LABORATORIES LIMITED (100.0%)  
Level 3 Tower One 25 Montpellier Road  
Bowen Hills, Queensland 4006, AU**

72 Inventor/es:

**OGBOURNE, STEVEN, MARTIN;  
THOMAS, DAVID;  
MOSELEY, RYAN y  
AYLWARD, JAMES, HARRISON**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

### Observaciones :

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

**ES 2 633 755 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**

Tratamiento de la piel

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al tratamiento cosmético de la piel envejecida. Más específicamente, la invención se refiere al uso de compuestos ingenol, particularmente angelatos ingenol, en el tratamiento de la piel fotoenvejecida y/o envejecida cronológica.

Antecedentes de la invención

10 El envejecimiento de la piel es un proceso dinámico que se efectúa no sólo por alteraciones celulares y extracelulares intrínsecas durante el paso del tiempo, sino también por factores ambientales o extrínsecos, tales como la nutrición inadecuada, el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol y, particularmente, exposición crónica a radiación UV.

15 El envejecimiento cutáneo intrínseco o cronológico es el resultado de la degeneración inherente del tejido conectivo de la dermis. Esta forma de envejecimiento de la piel es inevitable, aunque las influencias genéticas pueden retardar su aparición y/o progresión clínica. La piel envejecida intrínsecamente se manifiesta por atrofia epidérmica y dérmica, aplanamiento de las crestas interpapilares epidérmicas, así como disminución del número de fibroblastos y mastocitos y disminución de los niveles de colágeno. Esto es cosméticamente caracterizado por una apariencia generalmente sin manchas, pero con líneas finas, arrugas y pérdida de elasticidad. (Baumann, L, 2007; Helfrich, Y. R, 2008; y las referencias citadas en la misma).

20 El fotoenvejecimiento, un factor causante común en el envejecimiento extrínseco es el término usado para describir los efectos cosméticos y fisiológicos de la exposición a largo plazo de la piel a la radiación UV ambiental o artificial. Mientras que el fotoenvejecimiento puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo que se expone a la radiación UV, se produce más comúnmente en la cara, los brazos, las manos, el cuello y la parte superior del pecho. La piel fotoenvejecida se manifiesta por un aumento en el grosor epidérmico o atrofia epidérmica y sobre todo por elastosis solar, la acumulación de material que contiene elastina justo debajo de la unión dermoepidérmica. El colágeno y las fibras elásticas se fragmentan y desorganizan. A nivel cosmético, se puede observar como enrojecimiento y/o engrosamiento de la piel (resultando en una apariencia coriácea), fragilidad de la piel y pigmentación irregular, pérdida de tono y elasticidad (Baumann, L, 2007; Helfrich, Y. R, 2008; y las referencias citadas en la misma), así como arrugas, sequedad, manchas solares y formación de surcos profundos.

30 El hialuronano, o ácido hialurónico (HA), es un componente polisacárido no sulfatado de alto peso molecular ( $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^7$  Da) de la familia de los glicosaminoglicanos y es un componente importante de la matriz extracelular dérmica (ECM), realizando muchas funciones fisiológicas y estructurales pivotales. Consiste en la repetición de unidades disacáridas de los azúcares N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico y se sintetiza por las enzimas HA sintasa (HAS) de las cuales se han aislado y caracterizado tres genes vertebrados como HAS1, HAS2 y HAS3. El hialuronano se puede unir hasta 1000 veces su peso en agua y, junto con otros glicosaminoglicanos (GAGs) ayuda a la piel a retener y mantener el agua, manteniendo así un aspecto suave y firme. Se encuentra tanto en la dermis como en la epidermis, particularmente en los espacios intercelulares epidérmicos, y es producida principalmente por fibroblastos y queratinocitos.

40 La piel fetal embrionaria/precoz gestacional, la piel arquetípica no envejecida cronológicamente/no fotoenvejecida, se caracteriza por niveles elevados de hialuronano. En la piel fetal mejora la reorganización de la red de colágeno y mejora la síntesis de los tipos de colágeno III y V y en la piel joven, hialuronano se encuentra en la periferia de las fibras de colágeno y elastina y donde estos se cruzan. En contraste, la piel envejecida se caracteriza por los niveles crecidos de hialuronano y la piel fotoenvejecida también se ha observado para exhibir niveles reducidos de hialuronano. (Baumann, L., 2007 y las referencias citadas en la misma).

45 El aumento de los niveles de hialuronano asociado con la piel no envejecida cronológicamente/no fotoenvejecida, se ha atribuido a una mayor expresión del gen de la hialuronano sintasa (HAS). Es comúnmente aceptado que tres genes HAS son responsables de la regulación de la hialuronano sintasa; HAS1, HAS2 y HAS3. La expresión génica de HAS1 está ausente de fibroblastos no envejecidos/no fotoenvejecidos. HAS2 se reconoce como esencial para el desarrollo embrionario/fetal y HAS3 se asocia con la piel cronológicamente envejecida/fotoenvejecida. El peso molecular del hialuronano (en conjunción con la concentración), también es importante para influir en la arquitectura de la piel, con hialuronano de alto peso molecular formando una capa pericelular más eficaz que el hialuronano de bajo peso molecular (Meran *et al*, 2007, 2008; Stem and Maibach, 2008). De hecho, el peso molecular del hialuronano recién sintetizado en la piel humana es de alto peso molecular, tanto en la epidermis como en la dermis. Aunque HAS1 y HAS3 están asociados con la síntesis de hialuronano de menor peso molecular y como se ha descrito anteriormente están asociados con piel envejecida/fotoenvejecida, el hialuronano derivado de HAS2 es de alto peso molecular (por lo general al menos  $1.5 \times 10^6$ Da).

Aunque se reconoce ampliamente que la manera mejor y más eficaz de prevenir, o al menos minimizar, el proceso de fotoenvejecimiento es evitar la exposición de la piel a la radiación UV, a saber, permanecer fuera del sol y usar ropa protectora y protector solar, el proceso de envejecimiento intrínseco es inevitable y sigue existiendo una fuerte demanda en la sociedad actual obsesionada con la juventud por tratamientos que pueden "retroceder el tiempo" al invertir o al menos mejorar o reparar una o más de las manifestaciones cosméticas del proceso de envejecimiento cronológico y/o fotoenvejecimiento tal como líneas, arrugas, sequedad, surcos, enrojecimiento, espesamiento, manchas solares, pérdida de tono y elasticidad, fragilidad y pigmentación irregular. De hecho, la demanda de los consumidores de agentes cosméticos que puede restaurar una apariencia juvenil a la piel envejecida cronológicamente y/o fotoenvejecimiento, en particular la piel facial, está aumentando cada vez más, con el mercado de anti-envejecimiento que espera alcanzar más de \$16.5 mil millones en ventas en 2010 solo en los Estados Unidos (Helfrich, Y.R., *et al*, 2008).

Dada esta demanda, e incluso si KR 2001 0057776 describe los usos cosméticos del ingenol-20-palmitato, sigue existiendo la necesidad de nuevos tratamientos que puedan ayudar a revertir, mejorar o reparar de otro modo una o más de las manifestaciones cosméticas asociadas con el envejecimiento cronológico y fotoenvejecimiento de la piel.

15 Resumen de la invención.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que ingenol-3-angelato, un compuesto ingenol encontrado en especies de *Euphorbia*, induce síntesis endógena de hialuronano de alto peso molecular en fibroblastos dérmicos. De este modo, se proporciona un método para mejorar la apariencia cosmética de la piel, en particular la piel envejecida cronológicamente o fotoenvejecida, como se define en las reivindicaciones.

20 Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa gráficamente la síntesis de hialuronano promedio, por fibroblastos dérmicos, cultivados en 0 µg/ml, 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml o 100 µg/ml de PEP005, en ausencia y presencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), a (A) 24 h y (B) 72 h, (N=3, promedio ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001, en comparación con controles de fibroblastos dérmicos libres de PEP005).

25 La figura 2 representa imágenes digitales representativas, obtenidas de la formación de recubrimiento pericelular de hialuronano, por fibroblastos dérmicos, cultivados en (A) 0, (B) 0.01 µg/ml, (C) 0.1 µg/ml, (D) 1 µg/ml, (E) 10 µg/ml y (F) 100 µg/ml de PEP005, en ausencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), a 24 h (x200).

30 La figura 3 representa imágenes digitales representativas, obtenidas de la formación de recubrimiento pericelular de hialuronano, por fibroblastos dérmicos, cultivados en (A) 0, (B) 0.01 µg/ml, (C) 0.1 µg/ml, (D) 1 µg/ml, (E) 10 µg/ml y (F) 100 µg/ml de PEP005, en ausencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), a 72 h (x200).

La figura 4 representa imágenes digitales representativas, obtenidas de la formación de recubrimiento pericelular de hialuronano, por fibroblastos dérmicos, cultivados en (A) 0, (B) 0.01 µg/ml, (C) 0.1 µg/ml, (D) 1 µg/ml, (E) 10 µg/ml y (F) 100 µg/ml de PEP005, en presencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), a 24 h (x200).

35 La figura 5 representa imágenes digitales representativas, obtenidas de la formación de recubrimiento pericelular de hialuronano, por fibroblastos dérmicos, cultivados en (A) 0, (B) 0.01 µg/ml, (C) 0.1 µg/ml, (D) 1 µg/ml, (E) 10 µg/ml y (F) 100 µg/ml de PEP005, en presencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), a 72 h (x200).

40 La figura 6 representa la expresión promedio del gen HAS1, por fibroblastos dérmicos, cultivados en 0 µg/ml, 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml o 100 µg/ml de PEP005, en ausencia y presencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), para (A) 24 h y (B) 72 h (N=2, promedio ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01, en comparación con controles de fibroblastos dérmicos, libres de PEP005).

La figura 7 representa la expresión promedio del gen HAS2, por fibroblastos dérmicos, cultivados en 0 µg/ml, 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml o 100 µg/ml de PEP005, en ausencia y presencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), para (A) 24 h y (B) 72 h (N=3, promedio ± SE).

45 La figura 8 representa la expresión promedio del gen HAS3, por fibroblastos dérmicos, cultivados en 0 µg/ml, 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml o 100 µg/ml de PEP005, en ausencia y presencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), para (A) 24 h y (B) 72 h (N=3, promedio ± SE).

La figura 9 representa la incorporación de [3H]-glucosamina (el día 1) de fibroblastos dérmicos tratados con 0, 0.01, 0.1, 1.0 y 10 µg/ml de PEP005 en ausencia de TGF-β<sub>1</sub>.

50 La figura 10 representa la incorporación de [3H]-glucosamina (el día 3) de fibroblastos dérmicos tratados con 0, 0.01, 0.1, 1.0 y 10 µg/ml de PEP005 en ausencia de TGF-β<sub>1</sub>.

La figura 11 representa la incorporación de [3H]-glucosamina (el día 1) de fibroblastos dérmicos tratados con 0, 0.01, 0.1, 1.0 y 10 µg/ml de PEP005 en presencia de TGF-β<sub>1</sub>.

La figura 12 representa la incorporación de [3H]-glucosamina (el día 3) de fibroblastos dérmicos tratados con 0, 0.01, 0.1, 1.0 y 10 µg/ml de PEP005 en presencia de TGF-β<sub>1</sub>.

## 5 Descripción detallada de la invención

Las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un ingenano sustituido con angelolo" o "un ingenol angelato" incluye un compuesto único, así como dos o más compuestos según sea apropiado.

10 A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo exija de otro modo, la palabra "comprenden" y las variaciones tales como "comprende" y "comprendiendo" se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa indicado o grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros.

15 Como se usa en este documento, el "tratamiento" se entiende que se refiere a una mejora, restauración total o parcial, o al menos alguna inversión en la apariencia estética o cosmética y/o propiedades fisiológicas (tales como una mayor presencia de hialuronano) de la piel. Cosméticamente, esto puede incluir la reducción, eliminación, mejora o de otro modo reparación en la aparición de uno o más de sequedad, líneas finas, arrugas, surcos, enrojecimiento, manchas solares y pigmentación irregular.

20 Esto se puede evaluar o determinar por cualquier medio comúnmente utilizado en la técnica. Un método de ejemplo utiliza TruVu® Photography como se describe en este documento. Otros métodos pueden incluir la medición o evaluación de arrugas de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

La referencia a "hialuronano de alto peso molecular" se refiere a un valor de peso molecular de al menos aproximadamente 1.5 x 10<sup>6</sup> Da. Los valores de peso molecular se pueden determinar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica tales como cromatografía de filtración en gel frente a patrones conocidos, véase, por ejemplo, Simpson, R.M., *et al.* 2009.

25 La referencia a un "ingenol" incluye compuestos que tienen el esqueleto C3, C4, C5-trioxi transbicyclo [4.4.1]-undecano ingenano. Tales compuestos son ampliamente reportados y conocidos en la literatura y pueden ser aislados de plantas tales como de una especie de la familia *Euphorbiaceae* o sintetizados total o parcialmente químicamente (véase, por ejemplo, Winkler *et al.*, 2002, y Tanino *et al.*, 2003). Los compuestos ingenol sintéticamente preparados pueden incluir estereoisómeros de ingenoles de origen natural. De este modo, también se contemplan en este documento racematos y mezclas estereoisoméricas. Los compuestos contemplados en este documento se aíslan generalmente en extractos de las plantas *Euphorbiaceae*. Un extracto puede comprender, por lo tanto, una savia o un material líquido o semi-líquido exudado o presente en hojas, tallos, flores, corteza u otro material vegetal de la planta *Euphorbiaceae*. Por ejemplo, material vegetal entre la corteza y el tallo. Más preferiblemente, el extracto es de la savia. Además, el extracto puede comprender material líquido o semilíquido situado en fracciones extraídas de savia, hojas, tallos, flores, corteza u otro material vegetal de la planta *Euphorbiaceae*. Por ejemplo, el material vegetal se puede someter a manipulación física para interrumpir las fibras vegetales y el material de la matriz extracelular y extraerse inter e intra-tejido en un solvente que incluye un medio acuoso. Todas estas fuentes de los compuestos están abarcadas por la presente invención incluyendo compuestos obtenidos por vías de síntesis química. En ciertas realizaciones de la invención, el compuesto ingenol se usa en forma aislada o purificada, lo que significa que está o ha sido hecho sustancialmente libre o desprovisto de otros compuestos o agentes contaminantes de la fuente natural o aislamiento o proceso de síntesis. Sin embargo, se reconocerá que la forma purificada puede ser posteriormente mezclada o formulada con otros compuestos, incluyendo los de la fuente natural, si se desea. En ciertas realizaciones, el compuesto ingenol sustancialmente purificado es al menos 95% puro. En otras realizaciones, el compuesto sustancialmente purificado es al menos 97 o 98% puro. En aún otras realizaciones, el compuesto sustancialmente purificado es al menos 99 o 99.5% puro.

45 La referencia en este documento a un miembro de la familia *Euphorbiaceae* incluye referencia a especies de los géneros *Acalypha*, *Acidoton*, *Actinostemon*, *Adelia*, *Adenocline*, *Adenocrepis*, *Adenophaedra*, *Adisca*, *Agrostistachys*, *Alchornea*, *Alchorneopsis*, *Alcinaeanthus*, *Alcoceria*, *Aleurites*, *Amanoa*, *Andrachne*, *Angostyles*, *Anisophyllum*, *Antidesma*, *Aphora*, *Aporosa*, *Aporosella*, *Argythamnia*, *Astrococcus*, *Astrogyne*, *Baccanrea*, *Baliospermum*, *Bernardia*, *Beyeriopsis*, *Bischofia*, *Blachia*, *Blumeodondron*, *Bonania*, *Bradleia*, *Breynia*, *Breyniopsis*, *Briedelia*, *Burraevia*, *Caperonia*, *Caryodendron*, *Celianella*, *Cephalocroton*, *Chaenotheca*, *Chaetocarpus*, *Chamaesyce*, *Cheilosa*, *Chiropetalum*, *Choriophyllum*, *Cicca*, *Chaoxylon*, *Cleidon*, *Cleistanthus*, *Cluytia*, *Cnesmone*, *Cnidoscopus*, *Coccoceras*, *Codiaeum*, *Coelodiscus*, *Conami*, *Conceveiba*, *Conceveibastrum*, *Conceveibum*, *Corythea*, *Croizatia*, *Croton*, *Crotonopsis*, *Crozophora*, *Cubanthus*, *Cunuria*, *Dactylostemon*, *Dalechampia*, *Dendrocousinsia*, *Diaspersus*, *Didymocistus*, *Dimorphocalyx*, *Discocarpus*, *Ditaxis*, *Dodecastingma*, *Drypetes*, *Dysopsis*, *Elateriospermum*, *Endadenium*, *Endospermum*, *Erismanthus*, *Erythrocarpus*, *Erythrochilus*, *Eumecanthus*, *Euphorbia*, *Euphorbiodendron*, *Excoecaria*, *Flueggea*, *Calcaria*, *Garcia*, *Gavarretia*, *Gelonium*, *Gira*, *Givotia*, *Glochidion*, *Clochidionopsis*, *Glycydendron*, *Gymnanthes*, *Gymnosparia*, *Haematospermum*, *Hendecandra*, *Hevea*, *Hieronima*, *Hieronyma*,

5 *Hippocrepandra, Homalanthus, Hymenocardia, Janipha, Jatropha, Julocroton, Lasiocroton, Leiocarpus, Leonardia, Lepidanthus, Leucocroton, Mabea, Macaranga, Mallotus, Manihot, Mappa, Maprounea, Melanthesa, Mercurialis, Mettenia, Micrandra, Microdesmis, Microelus, Microstachy, Maocroton, Monadenium, Mozinna, Neoscortechinia, Omalanthus, Omphalea, Ophellantha, Orbicularia, Ostodes, Oxydectes, Palenga, Pantadenia, Paradrypetes,*  
 10 *Pausandra, Pedilanthus, Pera, Peridium, Petalostigma, Phyllanthus, Picrodendro, Pierardia, Pilinophytum, Pimeleodendron, Piranhea, Platygyne, Plukenetia, Podocalyx, Poinsettia, Poraresia, Prosartema, Pseudanthus, Pycnocomia, Quadrasia, Reverchonia, Richeria, Richeriella, Ricinella, Ricinocarpus, Rottleria, Sagotia, Sanwithia, Sapium, Savia, Sclerocroton, Sebastiana, Securinega, Senefelderia, Senefilderopsis, Serophyton, Siphonia, Spathiostemon, Spixia, Stillingia, Strophoblachia, Synadenium, Tetracoccus, Tetraplandra, Tetrochidium, Thyrsanthera, Tithymalus, Trageia, Trewia, Trigonostemon, Tyria y Xylophylla.*

Un género preferido y particularmente apropiado para la práctica de la presente invención es el género *Euphorbia*. Las especies particularmente útiles de este género incluyen *Euphorbia aaronrossii, Euphorbia abbreviata, Euphorbia acuta, Euphorbia alatocaulis, Euphorbia albicaulis, Euphorbia algomarginata, Euphorbia aliciae, Euphorbia alta, Euphorbia anacamperos, Euphorbia andromedae, Euphorbia angusta, Euphorbia anthonyi, Euphorbia antiguensis, Euphorbia apocynifolia, Euphorbia arabica, Euphorbia ariensis, Euphorbia arizonica, Euphorbia arkansana, Euphorbia artegae, Euphorbia arundelana, Euphorbia astroites, Euphorbia atrococca, Euphorbia baselicis, Euphorbia batabanensis, Euphorbia bergeri, Euphorbia bermudiana, Euphorbia bicolor, Euphorbia biformis, Euphorbia bifurcata, Euphorbia bilobata, Euphorbia biramensis, Euphorbia biuncialis, Euphorbia blepharostipula, Euphorbia blodgetti, Euphorbia boerhaavioides, Euphorbia boliviana, Euphorbia bracei, Euphorbia brachiata, Euphorbia brachycera, Euphorbia brandegeei, Euphorbia brittonii, Euphorbia caesia, Euphorbia calcicola, Euphorbia campestris, Euphorbia candelabrum, Euphorbia capitellata, Euphorbia carmenensis, Euphorbia carunculata, Euphorbia cayensis, Euphorbia celastroides, Euphorbia chalicophila, Euphorbia chamaerhodos, Euphorbia chamaesula, Euphorbia chiapensis, Euphorbia chiogenoides, Euphorbia cinerascens, Euphorbia clarionensis, Euphorbia colimae, Euphorbia colorata, Euphorbia commutata, Euphorbia consoquitlae, Euphorbia convolvuloides, Euphorbia corallifera, Euphorbia creberrima, Euphorbia crenulata, Euphorbia cubensis, Euphorbia cuspidata, Euphorbia cymbiformis, Euphorbia darlingtonii, Euphorbia defoliata, Euphorbia degeneri, Euphorbia deltoidea, Euphorbia dentata, Euphorbia depressa, Euphorbia dictyosperma, Euphorbia dioeca, Euphorbia discoidalis, Euphorbia dorsiventralis, Euphorbia drumondii, Euphorbia duclouxii, Euphorbia dussii, Euphorbia eanophylla, Euphorbia eggersii, Euphorbia eglandulosa, Euphorbia elata, Euphorbia enalla, Euphorbia eriogonoides, Euphorbia eriophylla, Euphorbia esculaeformis, Euphorbia espirotuensis, Euphorbia esula, Euphorbia excisa, Euphorbia exclusiva, Euphorbia exstipitata, Euphorbia exstipulata, Euphorbia fendleri, Euphorbia filicaulis, Euphorbia filiformis, Euphorbia florida, Euphorbia fruticulosa, Euphorbia garber, Euphorbia gaumerii, Euphorbia gerardiana, Euphorbia geyeri, Euphorbia glyptosperma, Euphorbia gorgonis, Euphorbia gracilior, Euphorbia gracillima, Euphorbia gradyi, Euphorbia graminea, Euphorbia graminea, Euphorbia grisea, Euphorbia guadalajarana, Euphorbia guanarensis, Euphorbia gymnadenia, Euphorbia haematantha, Euphorbia hedyotoides, Euphorbia heldrichii, Euphorbia helenae, Euphorbia helleri, Euphorbia hewigii, Euphorbia henricksonii, Euphorbia heterophylla, Euphorbia hexagona, Euphorbia hexagonoides, Euphorbia hinkleyorum, Euphorbia hintonii, Euphorbia hirtula, Euphorbia hirta, Euphorbia hooveri, Euphorbia humistrata, Euphorbia hypericifolia, Euphorbia inundata, Euphorbia involuta, Euphorbia jaliscensis,*

*Euphorbia jejuna, Euphorbia johnston, Euphorbia juttae, Euphorbia knuthii, Euphorbia lasiocarpa, Euphorbia lata, Euphorbia latazi, Euphorbia latericolor, Euphorbia laxiflora, Euphorbia lecheoides, Euphorbia ledienii, Euphorbia leucophylla, Euphorbia lineata, Euphorbia linguiformis, Euphorbia longecornuta, Euphorbia longepetiolata, Euphorbia longeramosa, Euphorbia longinsulicola, Euphorbia longipila, Euphorbia lupulina, Euphorbia lurida, Euphorbia lycioides, Euphorbia macropodoides, Euphorbia macvaughiana, Euphorbia manca, Euphorbia mandoniana, Euphorbia mangletii, Euphorbia mango, Euphorbia marylandica, Euphorbia mayana, Euphorbia melanadenia, Euphorbia melanocarpa, Euphorbia meridensis, Euphorbia mertonii, Euphorbia mexiae, Euphorbia microcephala, Euphorbia microclada, Euphorbia micromera, Euphorbia misella, Euphorbia missurica, Euphorbia montana, Euphorbia montereyana, Euphorbia multicaulis, Euphorbia multiformis, Euphorbia multinodis, Euphorbia multiseta, Euphorbia muscicola, Euphorbia neomexicana, Euphorbia nephradenia, Euphorbia niqueroana, Euphorbia oaxacana, Euphorbia occidentalis, Euphorbia odontodenia, Euphorbia olivacea, Euphorbia olowaluana, Euphorbia ophthalmica, Euphorbia ovata, Euphorbia pachypoda, Euphorbia pachyrhiza, Euphorbia padifolia, Euphorbia palmeri, Euphorbia paludicola, Euphorbia parciflora, Euphorbia parishii, Euphorbia parryi, Euphorbia paxiana, Euphorbia pediculifera, Euphorbia peploidion, Euphorbia peploides, Euphorbia peplus, Euphorbia pergamena, Euphorbia perlignea, Euphorbia petaloidea, Euphorbia petrina, Euphorbia picachensis, Euphorbia pilosula, Euphorbia pilulifera, Euphorbia pinariona, Euphorbia pinetorum, Euphorbia pionosperma, Euphorbia platysperma, Euphorbia plicata, Euphorbia poeppigii, Euphorbia poliosperma, Euphorbia polycarpa, Euphorbia polycnemoides, Euphorbia polyphylla, Euphorbia portoricensis, Euphorbia portulacoides, Euphorbia portulana, Euphorbia preslii, Euphorbia prostrata, Euphorbia pteroneura, Euphorbia pycnanthema, Euphorbia ramosa, Euphorbia rapulum, Euphorbia remyi, Euphorbia retoscabra, Euphorbia revoluta, Euphorbia rivularis, Euphorbia robusta, Euphorbia romosa, Euphorbia rubida, Euphorbia rubrosperma, Euphorbia rupicola, Euphorbia sanmartensis, Euphorbia saxatilis M. Bieb, Euphorbia schizoloba, Euphorbia sclerocyathium, Euphorbia scopulorum, Euphorbia senilis, Euphorbia serpyllifolia, Euphorbia serrula, Euphorbia setiloba Engelm, Euphorbia sonora, Euphorbia soobyi, Euphorbia sparsiflora, Euphorbia sphaerosperma, Euphorbia syphilitica, Euphorbia spruceana, Euphorbia subcoerulea, Euphorbia stellata, Euphorbia submammilaris, Euphorbia subpeltata, Euphorbia subpubens, Euphorbia subreniforme, Euphorbia subtrifoliata, Euphorbia succedanea, Euphorbia tamaulipasana, Euphorbia telephioides, Euphorbia tenuissima, Euphorbia tetrapora, Euphorbia tirucalli, Euphorbia tomentella, Euphorbia tomentosa, Euphorbia torralbasii, Euphorbia*

*tovariensis*, *Euphorbia trachysperma*, *Euphorbia tricolor*, *Euphorbia troyana*, *Euphorbia tuerckheimii*, *Euphorbia turczaninowii*, *Euphorbia umbellulata*, *Euphorbia undulata*, *Euphorbia vermiformis*, *Euphorbia versicolor*, *Euphorbia villifera*, *Euphorbia violacea*, *Euphorbia whitei*, *Euphorbia xanti* Engelm, *Euphorbia xylopoda* Greenm., *Euphorbia yayalesia* Urb., *Euphorbia yungasensis*, *Euphorbia zeravschanica* y *Euphorbia zinniiflora*.

5 En realizaciones adicionales, las especies del género *Synadenium* incluyen *Synadenium grantii* y *Synadenium compactum*.

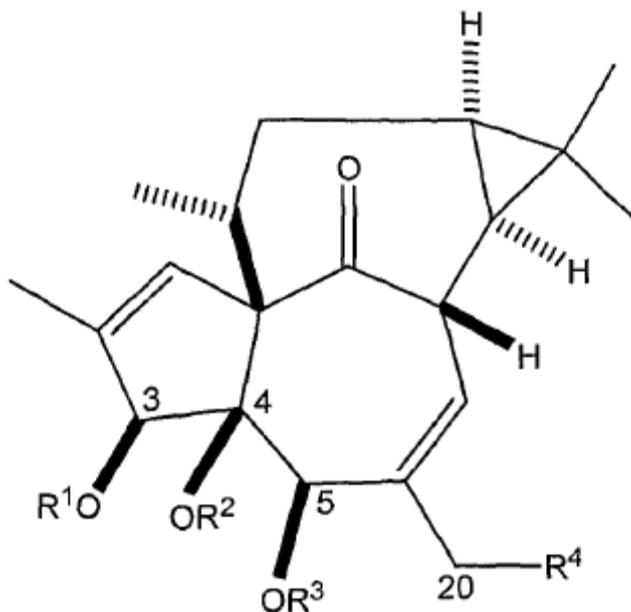
En realizaciones adicionales, las especies del género *Monadenium* incluyen *Monadenium lugardae* y *Monadenium guentheri*.

En una realización, una especie del género *Endadenium* es *Endadenium gossweileni*.

10 En otra realización, *Euphorbia peplus* es útil en la práctica de la presente invención en términos de proporcionar una fuente de compuestos ingenol tales como ingenol angelatos. La referencia en este documento a "*Euphorbia peplus*" o su abreviatura "*E. peplus*" incluye diversas variedades, cepas, líneas, híbridos o derivados de esta planta, así como sus parientes botánicos u hortícolas. Además, la presente invención se puede practicar usando una planta entera de *Euphorbiaceae* o partes de la misma incluyendo savia o semillas u se puede utilizar otro material reproductivo. En  
15 general, para que se utilicen semillas o material reproductivo, primero se debe propagar una planta o plántula.

La referencia en este documento a una planta *Euphorbiaceae*, una especie *Euphorbia* o *E. peplus* abarca además plantas modificadas genéticamente. Las plantas modificadas genéticamente incluyen plantas o plantas transgénicas en las que se ha eliminado un rasgo o en el que se ha inhibido la expresión, mutado o de otra manera alterado una  
20 secuencia génica endógena incluyendo la alteración o introducción de material genético que exhibe un efecto regulador sobre un gen particular. En consecuencia, una planta que exhibe un carácter que no se encuentra de forma natural en una planta de *Euphorbiaceae* o una especie de *Euphorbia* o en *E. peplus*, no obstante, está contemplada por la presente invención y está incluida dentro del alcance de los términos antes mencionados.

En una realización de la invención, el compuesto ingenol tiene la fórmula:



25 en la que

R<sup>1</sup>-R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alquenoilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, acilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, S(O)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, S(O)<sub>2</sub>OR<sup>1</sup>, P(O)(OR<sup>1</sup>)<sub>2</sub> (en los que R<sup>1</sup> es hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo, acilo, arilo, o arilalquilo) y glicosil o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> o R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> pueden formar una cadena de metileno o etileno; y

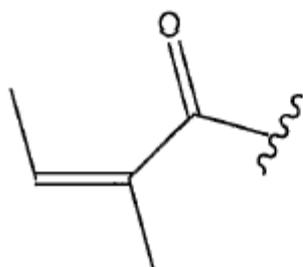
30 R<sup>4</sup> se selecciona entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoxi opcionalmente sustituido, alquinoxilo opcionalmente sustituido, aciloxilo opcionalmente sustituido, arilalcoxi opcionalmente sustituido, OS(O)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, OS(O)<sub>2</sub>OR<sup>1</sup>, OP(O)(OR<sup>1</sup>)<sub>2</sub> (en los que R<sup>1</sup> es hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo, acilo, arilo, o arilalquilo) y glicosil,

en los que,

R<sup>1</sup> no es hidrógeno.

5 En algunos ejemplos de la invención, R<sup>1</sup> es un grupo acilo opcionalmente sustituido C(O)-R. En ejemplos adicionales de los mismos, R es alquilo, alquenilo o alquinilo opcionalmente sustituido. En ejemplos adicionales de los mismos, R puede ser de cadena lineal o ramificada y puede tener hasta 6 o hasta 10 átomos de carbono. En aún ejemplos adicionales de los mismos, R está ramificado.

En ciertos ejemplos de la invención, uno de R<sup>1</sup>-R<sup>3</sup> es un grupo angeloilo, como se representa mediante la fórmula (i) siguiente, o R<sup>4</sup> es un grupo O-angeloilo. Tales compuestos se denominan en este documento como ingenol angelatos. En uno de tales ejemplos de la invención, R<sup>1</sup> es un grupo angeloilo de fórmula (i).



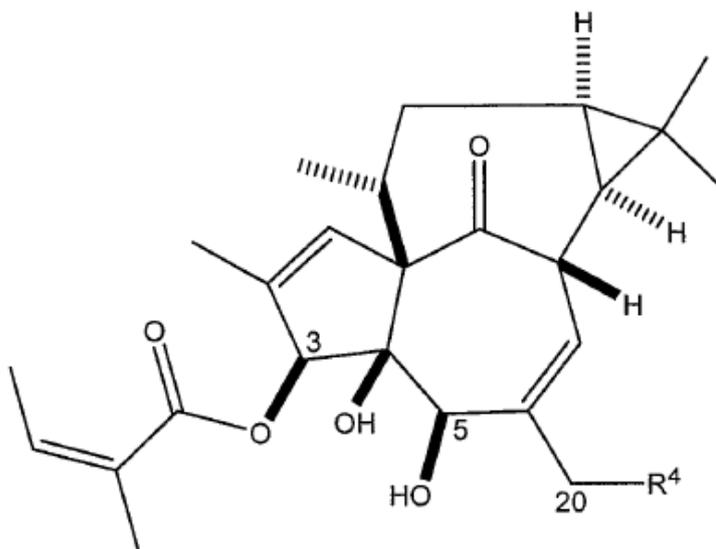
(i)

10

En ciertos ejemplos de la invención, uno o ambos de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son hidrógeno. R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> juntos también pueden formar un grupo metileno o etilendioxi.

En ciertos ejemplos de la invención R<sup>4</sup> es hidrógeno, hidroxilo o aciloxi tal como un grupo de la fórmula-OC(O) alquilo C<sub>1-6</sub>, por ejemplo, acetoxi.

15 En ciertos ejemplos de la invención, los compuestos para uso en los métodos descritos son ingenol-3-angelato, 20-O-acetil-ingenol-3-angelato y 20-desoxi-ingenol-3-angelato (representados a continuación) y sales de los mismos.



R<sup>4</sup> = OH, ingenol-3-angelato

R<sup>4</sup> = OAc, 20-O-acetil-ingenol-3-angelato

20 R<sup>4</sup> = H, 20-desoxi-ingenol-3-angelato

En una realización de la presente invención, el compuesto es ingenol-3-angelato. La referencia en este documento al "ingenol-3-angelato" incluye formas de origen natural, así como químicamente sintéticas.

Los compuestos ingenol contemplados en este documento se usan en forma aislada.

La alquilación, la alquenación, la alquinilación, la arilación, la arilalquilación o la acilación se puede llevar a cabo en los compuestos ingenol utilizando métodos conocidos en la técnica de la química de síntesis para alquilar, alquenilar, alquinilar, arilar, arilalquilar o acilar grupos hidroxilo libres (véase, por ejemplo, Greene and Wutz, Protective Groups in Organic Synthesis, 1999; March, Advanced Organic Chemistry, 5<sup>th</sup> Edition; Larock, Comprehensive Organic Transformations, 1999; cuyo contenido completo se incorpora en este documento como referencia). Por ejemplo, los grupos hidroxilo se pueden alquilar (o arilalquilar) usando haluros de alquilo (o arilalquilo), tales como yoduro de metilo (o bromuro de bencilo), o sulfatos de dialquilo, tales como sulfato de dimetilo o dietilo. La acilación se puede efectuar por tratamiento con ácidos carboxílicos apropiados, haluros de ácido y anhídridos de ácido en presencia de una base o un agente de acoplamiento. La formación glicosídica se puede efectuar químicamente, por ejemplo, haciendo reaccionar el compuesto ingenol con un compuesto de azúcar protegido en el que C-1 ha sido activado por halogenación para acoplamiento con los grupos hidroxilo o carboxilo y los grupos hidroxilo de azúcar han sido bloqueados por grupos protectores. Alternativamente, la formación de glicósido se puede efectuar enzimáticamente usando una glicosiltransferasa apropiada tal como galactosiltransferasa dependiente de UDP-galactosa y glicosiltransferasa dependiente de UDP-glucosa. Los sacáridos unidos a C-1 preferidos son un sustituyente de furanosa o sacárido de piranosa (azúcar) que está unido a la estructura de ingenol angelato a través de C-1 del sacárido (numeración convencional) para formar un enlace acetilo. Los grupos sacáridos de ejemplo incluyen azúcares reductores tales como glucosa, ribosa, arabinosa, xilosa, manosa y galactosas, estando cada uno unido a un átomo de oxígeno del compuesto ingenol.

Los grupos sulfato, sulfonato y fosfato se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de R' incluyen hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, fenilo y bencilo.

Como se usa en este documento, el término "alquilo" indica alquilo de cadena lineal o ramificada, preferiblemente alquilo C<sub>1-20</sub>, por ejemplo, C<sub>1-10</sub> o C<sub>1-6</sub>, ejemplos de alquilo de cadena lineal y ramificada incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, 1,2-dimetilpropilo, 1,1-dimetil-propilo, hexilo, 4-metilpentilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, heptilo, 5-metilhexilo, 1-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 4,4-dimetilpentilo, 1,2-dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,4-dimetil-pentilo, 1,2,3-trimetilbutilo, 1,1,2-trimetilbutilo, 1,1,3-trimetilbutilo, octilo, 6-metilheptilo, 1-metilheptilo, 1,1,3,3-tetrametilbutilo, nonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-metil-octilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-etilheptilo, 1-, 2- o 3-propilhexilo, decilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- y 8-metilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-etildecilo, 1-, 2-, 3- o 4-propilheptilo, undecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-metildecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-etilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-propildecilo, 1-, 2- o 3-butilheptilo, 1-pentilhexilo, dodecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-metilundecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-etildecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-propilnonilo, 1-, 2-, 3- o 4-butildecilo, 1-2-pentilheptilo y similares. Cuando un grupo alquilo se denomina generalmente como "propilo", "butilo" etc, se entenderá que esto se puede referir a cualquiera de los isómeros cíclicos y ramificados, lineales cuando sea apropiado. Un grupo alquilo puede ser opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes opcionales como se define en este documento.

Un grupo "cicloalquilo" es un grupo alquilo cíclico de al menos tres átomos de carbono, por ejemplo, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, tal como cicloalquilo C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> o C<sub>6</sub>. Ejemplos de "cicloalquilo" incluyen grupos mono o policíclico alquilo tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo y similares. Un grupo cicloalquilo puede ser opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes opcionales como se define en este documento.

El término "alqueno", como se usa en este documento, indica grupos formados a partir de residuos de hidrocarburo cíclicos o de cadena lineal, ramificada o cíclica que contienen al menos un doble enlace de carbono a carbono incluyendo grupos alquilo o cicloalquilo etilénicamente mono, di o poliinsaturados como se ha definido anteriormente, preferiblemente alqueno C<sub>2-20</sub> (por ejemplo, C<sub>2-10</sub> o C<sub>2-6</sub>). Ejemplos de alqueno incluyen vinilo, alilo, 1-metilvinilo, butenilo, iso-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-pentenilo, ciclopentenilo, 1-metil-ciclopentenilo, 1-hexenilo, 3-hexenilo, ciclohexenilo, 1-heptenilo, 3-heptenilo, 1-octenilo, ciclooctenilo, 1-nonenilo, 2-nonenilo, 3-nonenilo, 1-decenilo, 3-decenilo, 1,3-butadienilo, 1-4-pentadienilo, 1,3-ciclopentadienilo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 1,3-ciclohexadienilo, 1,4-ciclohexadienilo, 1,3-cicloheptadienilo, 1,3,5-cicloheptatrienilo y 1,3,5,7-ciclooctatetraenilo. Un grupo alqueno puede ser opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes opcionales como se define en este documento.

Como se usa en este documento, el término "alquino" indica grupos formados a partir de residuos de hidrocarburo de cadena lineal, ramificada o cíclica que contienen al menos un enlace triple carbono-carbono que incluye grupos alquilo o cicloalquilo mono, di o poliinsaturados etinicamente como se ha definido anteriormente. A menos que se especifique el número de átomos de carbono, el término se refiere preferiblemente a alquino C<sub>2-20</sub> (por ejemplo, C<sub>2-10</sub> o C<sub>2-6</sub>). Los ejemplos incluyen isómeros de etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo y butinilo, e isómeros de pentinilo. Un grupo alquino puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes opcionales como se define en este documento.

El término "arilo" indica cualquiera de los residuos únicos, polinucleares, conjugados y fusionados de sistemas de anillos de hidrocarburos aromáticos. Ejemplos de arilo incluyen fenilo, bifenilo, terfenilo, quaterfenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, antraceno, dihidroantraceno, benzantraceno, dibenzantraceno, fenantrenilo, fluorenilo, pirenilo, idenilo, azulenilo, crisenilo. El arilo preferido incluye fenilo y naftilo. Un grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes opcionales como se define en este documento.

El término "acilo" indica un grupo C(O)-R, en el que R puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, arilalquilo o arilo. Ejemplos de acilo incluyen formilo, alcanilo de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, C<sub>1-</sub>

20) tal como acetilo, propanoilo, butanoilo, 2-metilpropanoilo, pentanoilo, 2,2-dimetilpropanoilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo, undecanoilo, dodecanoilo, tridecanoilo, tetradecanoilo, pentadecanoilo, hexadecanoilo, heptadecanoilo, octadecanoilo, nonadecanoilo e icosanoilo; cicloalquilcarbonilo tal como ciclopropilcarbonilciclobutilcarbonilo, ciclopentilcarbonilo y ciclohexilcarbonilo; alquenoilo de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, C<sub>2-20</sub>) tal como angeloilo; y aroilo tal como benzoilo, toluoilo y naftoilo. El residuo R puede estar opcionalmente sustituido como se describe en este documento.

Un grupo arilalquilo es un grupo alquilo como se define en este documento, sustituido por un grupo arilo como se define en este documento. En una realización, el grupo alquilo está terminalmente sustituido por el grupo arilo. Ejemplos de arilalquilo incluyen fenilalquilo C<sub>1-C20</sub> tal como bencilo, feniletilo, fenilpropilo, fenilbutilo, fenilpentilo y fenilhexilo. Uno o ambos de los grupos alquilo y arilo pueden estar independientemente opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes opcionales como se describe en este documento.

El término "opcionalmente sustituido" significa que un grupo puede ser no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes, iguales o diferentes. Los sustituyentes opcionales para alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, arilalquilo, arilo y, por tanto, acilo, incluyen: halo (cloro, bromo, yodo y flúor), hidroxilo, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, fenilo, nitro, halometilo (por ejemplo, tribromometilo, triclorometilo, trifluorometilo), halometoxi (por ejemplo, trifluorometoxi, tribromometoxi), C(O)alquilo C<sub>1-6</sub>, amino (NH<sub>2</sub>), alquilamino C<sub>1-6</sub> (por ejemplo, metilamino, etilamino y propilamino), dialquilamino C<sub>1-6</sub> (por ejemplo, dimetilamino, dietilamino y dipropilamino), CO<sub>2</sub>H CO<sub>2</sub> alquilo C<sub>1-6</sub>, tio (SH) y alquiltio C<sub>1-6</sub>. Un sustituyente opcional incluye también la sustitución de un grupo CH<sub>2</sub> por un grupo carbonilo (C=O) o puede ser un grupo metileno o etileno dioxo.

Se reconocerá que durante procesos sintéticos o semisintéticos para la preparación de compuestos ingenol contemplados por la presente invención, puede ser necesario o deseable proteger otros grupos funcionales que pueden ser reactivos o sensibles a las condiciones de reacción o transformación realizada. Los grupos protectores apropiados para dichos grupos funcionales son conocidos en la técnica y se puede usar de acuerdo con la práctica habitual. Como se usa en este documento, el término "grupo protector" se refiere a una funcionalidad introducida que temporalmente hace inactivo un grupo funcional particular bajo las condiciones a las que se someterá el compuesto. Tales grupos protectores y métodos para su instalación y posterior eliminación en una etapa apropiada son bien conocidos (Greene and Wutz, 1999, supra).

Las sales apropiados de los compuestos incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos inorgánicos tales como ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico nítrico, carbónico, bórico, sulfámico, bromhídrico o sales de ácidos orgánicos tales como ácido acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, maleico, cítrico, láctico, mucico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, salicílico sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, laúrico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico. Las sales básicas incluyen, pero no se limitan a, aquellas formadas con cationes farmacéuticamente aceptables, tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amonio y alquilamonio. Los grupos que contienen nitrógeno básico pueden ser cuaternizados con agentes tales como haluro de alquilo inferior, tal como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfato de dimetilo y dietilo; y otros.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina ya sea como compuestos libres o como solvatos (por ejemplo, de agua, esto es, hidratos o de solventes orgánicos comunes tales como alcoholes) y se pretende que ambas formas estén dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, recristalización a partir de un solvente dado.

Los sujetos para el tratamiento de acuerdo con la invención se seleccionan preferiblemente sobre la base de requerir o buscar dicho tratamiento.

Los compuestos ingenol se administran al sujeto en cantidades eficaces de tratamiento. Las cantidades eficaces apropiadas para la administración (dosificación) y los regímenes de dosificación pueden depender del aspecto cosmético, de la localización anatómica y del área de la piel que se está tratando, así como de la edad y estado general de salud del sujeto. Las composiciones apropiadas para uso en la invención pueden contener el compuesto ingenol en una cantidad desde aproximadamente 0.0001% hasta 100% en peso. En ciertas realizaciones, la composición contiene el compuesto ingenol en una cantidad de aproximadamente 0.0001% hasta aproximadamente 10% en peso, por ejemplo, aproximadamente 0.0005, 0.001, 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.0125, 0.015, 0.02, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2 o 0.25% a aproximadamente 0.5, 1.0, 2.5 o 5.0%. En una realización de la invención, el compuesto ingenol es ingenol-3-angelato presente en una cantidad de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1%. En una realización adicional el compuesto ingenol, por ejemplo, ingenol-3-angelato, está presente en una cantidad de aproximadamente 0.005 a aproximadamente 0.2%. En una realización adicional del mismo, el compuesto ingenol, tal como ingenol-3-angelato, puede estar presente en una cantidad desde 0.005 a 0.1 %, tal como aproximadamente 0.01 %.

Los compuestos ingenol se pueden administrar en cualquier forma apropiada, tal como localmente, por ejemplo, por aplicación tópica al área que requiere tratamiento, y/o por inyección en la piel. En los ejemplos particulares de la invención, el compuesto ingenol se administra por aplicación tópica al área o zonas de la piel.

La dosificación en la aplicación dependerá de una serie de factores que pueden ser determinados fácilmente por el experto en la materia, pero pueden ser una o más dosis por día, con un curso de tratamiento que dura varios días a varios meses o continuamente hasta que se efectúa el resultado deseado. En ciertas realizaciones, el compuesto ingenol se administra una o dos veces al día.

5 En una realización preferida de la invención, los compuestos ingenol se administran, es decir, se aplican por vía tópica al área que requiere tratamiento. Cualquier área de la piel del cuerpo se puede tratar de acuerdo con la invención. En realizaciones adicionales, la invención está dirigida al tratamiento de uno o más de la cara, cuello, garganta, zona alrededor de los ojos (por ejemplo, debajo del ojo, bolsas para los ojos y arrugas y patas de gallo), pecho superior, manos, espalda, hombros, cuero cabelludo y brazos, incluyendo los antebrazos. Ciertas realizaciones de la invención  
10 contemplan el tratamiento de la piel fotoenvejecida. Ventajosamente, el tratamiento se aplica a una zona de piel cronológicamente y/o foto envejecida de al menos 10 cm<sup>2</sup>. En otras realizaciones, la piel que se trata de acuerdo con la invención es una piel no enferma, esto es, no padece actualmente de enfermedad. En una realización de ejemplo, se pueden tratar zonas de la cara y/o el cuello/garganta de acuerdo con la invención. Los compuestos ingenol se pueden aplicar por vía tópica en cualquier forma apropiada incluyendo soluciones, emulsiones (aceite en agua, agua en aceite, aerosoles o espumas), ungüentos, pastas, lociones, polvos, pinturas, geles (tal como gel PEP005 (ingenol mebutato), Peplin Inc.), hidrogeles, hidrocoloides y cremas se pueden preparar de manera que contengan liposomas, micelas y/o microesferas. Alternativamente, los compuestos ingenol se pueden presentar en forma de un vendaje oclusivo activo, por ejemplo, donde el compuesto ingenol se impregna o se aplica sobre un apósito tal como vendajes, gasas, cintas, redes, máscaras faciales, esparadrapo, películas, membranas o parches

20 La formulación de composiciones y vendajes contemplados en este documento es bien conocida para los expertos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing, 1990. Las composiciones pueden contener portadores, diluyentes o excipientes apropiados. Estos incluyen todos los solventes convencionales, medios de dispersión, agentes de carga, portadores sólidos, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, mejoradores de la viscosidad, formadores de película, agentes de penetración dérmica, surfactantes, agentes isotónicos y de absorción y similares. El portador para composiciones contempladas por la presente invención debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no perjudicial para el sujeto.

Los ungüentos, como es bien conocido en la técnica de la formulación farmacéutica, son preparaciones semisólidas que están por lo general basadas en vaselina u otros derivados de petróleo. La base de ungüento específico que se utilizará, como se apreciará por los expertos en la técnica, es aquella que proporcionará un suministro óptimo de fármaco y, preferiblemente, proporcionará también otras características deseadas, por ejemplo, emoliencia o similares. Al igual que con otros portadores o vehículos, una base de ungüento debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante. Las bases de ungüento emulsionables, también conocidas como bases de ungüentos absorbentes, contienen poco o nada de agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Las bases de ungüento de emulsión son emulsiones de agua en aceite (W/O) o emulsiones de aceite en agua (O/W), e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases de ungüento solubles en agua preferidas se preparan a partir de polietilenglicoles de peso molecular variable.

Las cremas, también bien conocidas en la técnica, son líquidos viscosos o emulsiones semisólidas, ya sea aceite en agua o agua en aceite. Las bases de crema son lavables al agua, y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa, también denominada fase "interna", está generalmente constituida por vaselina y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico. La fase acuosa usualmente, aunque no necesariamente, excede la fase oleosa en volumen, y generalmente contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema es generalmente un surfactante no iónico, aniónico, catiónico o anfotérico.

Como apreciarán los que trabajan en el campo de la formulación, los geles son sistemas semisólidos de tipo suspensión. Los geles monofásicos contienen agentes gelificantes distribuidos de forma sustancialmente uniforme a través del líquido portador, que es por lo general acuoso, pero también, preferiblemente, contiene un alcohol tal como alcohol isopropílico y, opcionalmente, un aceite.

Las lociones, para el suministro de agentes cosméticos, son preparaciones para ser aplicadas a la superficie de la piel sin fricción, y son por lo general preparaciones líquidas o semilíquidas en las que las partículas sólidas, incluyendo el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones son usualmente suspensiones de sólidos, y preferiblemente, para el presente propósito, comprenden una emulsión oleosa líquida del tipo aceite en agua. Generalmente la materia insoluble en una loción está finamente dividida. Las lociones contendrán por lo general agentes de suspensión para producir mejores dispersiones, así como compuestos útiles para localizar y mantener el agente activo en contacto con la piel.

55 Las pastas son formas de dosificación semisólidas en las que el agente activo se suspende en una base apropiada. Dependiendo de la naturaleza de la base, las pastas se dividen entre pastas grasas o aquellas hechas de geles acuosos monofásicos. La base en una pasta grasa es generalmente vaselina o vaselina hidrófila o similar. Las pastas hechas de geles acuosos monofásicos generalmente incorporan carboximetilcelulosa o similares como una base.

En una realización de la invención, el compuesto ingenol se puede aplicar por vía tópica en forma de un gel a base de alcohol isopropílico. Una formulación apropiada incluye alcohol isopropílico, alcohol bencílico, un polímero de celulosa, tal como hidroxietilcelulosa y solución reguladora (por ejemplo, citrato) a un pH <3. En otra realización de la invención, el compuesto ingenol se puede formular para aplicación tópica en la forma de una crema de éter de macrocetilo, que contiene por ejemplo cera emulsionante de cetomacrogel, parafina blanda blanca y parafina líquida.

Las formulaciones también se pueden preparar con liposomas, micelas y microesferas. Los liposomas son vesículas microscópicas que tienen una pared lipídica que comprende una bicapa lipídica, y se pueden usar también como sistemas de administración de fármacos. Generalmente, las formulaciones de liposomas son preferidas para agentes farmacéuticos poco solubles o insolubles. Las preparaciones liposómicas para uso en la invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras.

Las micelas son conocidas en la técnica para estar compuestas de moléculas surfactantes dispuestas de manera que sus grupos principales polares formen una envoltura esférica externa, mientras que las cadenas hidrocarburo, hidrófobas están orientadas hacia el centro de la esfera, formando un núcleo. Las micelas se forman en una solución acuosa que contiene surfactante a una concentración suficientemente alta de modo que resultan naturalmente micelas. Se pueden usar formulaciones de micelas en conjunción con la presente invención ya sea por incorporación en el depósito de un sistema de suministro tópico o transdérmico, o en una formulación para ser aplicada a la superficie del cuerpo.

De manera similar, se pueden incorporar microesferas en las presentes formulaciones y sistemas de suministro de fármacos. Al igual que los liposomas y micelas, las microesferas esencialmente encapsulan un fármaco o una formulación que contiene fármaco. Las microesferas son generalmente, aunque no necesariamente, formadas a partir de polímeros biocompatibles sintéticos o de origen natural, pero también pueden estar constituidas por lípidos cargados tales como fosfolípidos. La preparación de microesferas es bien conocida en la técnica y descrita en los textos y literatura pertinentes.

Se entenderá que la invención también se puede practicar conjuntamente con el uso de otras formas de terapias antienvjecimiento o antifotoenvjecimiento, que incluyen, pero no se limitan a, rejuvenecimiento con láser, peelings químicos, renovación cutánea mecánica, (por ejemplo, dermoabrasión) y terapia fotodinámica (PDT) utilizados para tratar la piel envejecida cronológicamente o fotoenvejecida.

Los agentes adicionales que se van a utilizar junto con la invención se pueden formular en una composición o vendaje junto con el compuesto o compuestos ingenol o se pueden administrar por separado, ya sea secuencial o conjuntamente.

Se reconocerá que aunque los términos "envejecimiento cronológico" y "fotoenvejecimiento" se usan para referirse a los efectos cosméticos y/o fisiológicos sobre la piel como resultado del paso del tiempo y la exposición a la radiación UV, respectivamente, y que en ciertas realizaciones el sujeto puede ser un adulto de al menos 20, 30, 40, 50 o 60 años, la invención no se debe restringir a pacientes adultos y el compuesto ingenol o composición que comprende dicho compuesto se puede aplicar a bebés, niños o adolescentes según sea apropiado.

Los compuestos ingenol, por ejemplo, ingenol-3-angelato o una sal del mismo, pueden inducir síntesis de hialuronano endógena en la piel de un sujeto. Ventajosamente, se induce la síntesis de hialuronano de alto peso molecular. La evaluación del hialuronano endógeno inducido puede proporcionar ventajosamente un medio de ensayo o de evaluación para la eficacia de los compuestos ingenol.

En un ejemplo típico, las biopsias de piel (biopsias de punción de 4-6 mm) se fijan en formalina estandarizada al 10% y se incrustan en parafina. Las diapositivas, creadas a partir de los bloques de parafina, son desparafinadas y rehidratadas a través de una serie de xilol y alcoholes graduados. La peroxidasa endógena se bloquea sumergiendo los portaobjetos en peróxido de hidrógeno en metanol durante 30 min. Para la detección histoquímica de HA, se usa una proteína de unión a hialuronano biotilada (bHABP) derivada de cartílago bovino (Seikagaku Ltd, Tokio, Japón). Las placas se incuban durante la noche a 4°C con bHABP en solución salina estandarizada con fosfato (PBS) y albúmina de suero bovino. Después de lavar con PBS, todas las muestras se incuban con suero de cabra para bloquear sitios de unión no específicos. Después del lavado en PBS, las secciones se incuban a temperatura ambiente con complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit de tinción con peroxidasa Immunopure ABC, Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). La reacción se visualiza usando 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich) y peróxido de hidrógeno en PBS, a temperatura ambiente. Los portaobjetos se contratiñen con la hematoxilina de Mayer durante 30 s, se lavan, se deshidratan y se montan. Además, se describen protocolos en la técnica (véase, por ejemplo, Bertheim, U. and Hellström, S., 1994; Bertheim, U., *et al.*, 2004; Asari, A., *et al.*, 1992 y Zanna G., *et al.*, 2008).

Usando una solución reguladora caotrópica (tal como cloruro de guanidinio), la matriz extracelular dérmica (ECM) se puede extraer de la biopsia de piel. El hialuronano se puede entonces purificar a partir de la ECM mediante cromatografía de intercambio aniónico y el peso molecular se puede determinar usando cromatografía de filtración en gel con patrones conocidos (véase, por ejemplo, Simpson *et al.*, 2009).

La invención se describirá a continuación con referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen con el propósito de ilustrar ciertas realizaciones de la invención y no se deben considerar como limitantes de la generalidad descrita anteriormente.

Ejemplos

5 Tal como se utiliza de principio a fin, el término "PEP005" se refiere a y es intercambiable con ingenol-3-angelato

1. Materiales y métodos

1.1 No clínico

1.1.1 Cultivo de células de fibroblastos dérmicos

10 Se obtuvo una biopsia de piel de adulto normal (6 mm) (n=1), con consentimiento informado de un individuo que asistió a the Oral Surgery Clinic, School of Dentistry, Wales College of Medicine, Cardiff. Después de la aplicación de un anestésico local, se recogió la biopsia dérmica y se establecieron cultivos de fibroblastos dérmicos adultos mediante la técnica de suspensión de células individuales, después de la degradación enzimática de la muestra. Esta técnica se ha utilizado previamente con fiabilidad para establecer cultivos primarios viables de fibroblastos tanto orales como dérmicos in vitro (Cook *et al*, 2000; Stephens *et al*, 2001; 2003). Los fibroblastos dérmicos se cultivaron con un medio que contiene suero de fibroblastos, que contiene medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con L-glutamina (2 mM), antibióticos (100 U/ml de penicilina G sódica, 100 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B) y 10% de suero fetal bovino (todos adquiridos de Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido). Los cultivos de fibroblastos dérmicos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de aire al 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días. Se usaron fibroblastos dérmicos entre el paso 7-17, para todos los experimentos.

20 1.1.2 Preparación de PEP005

Se almacenó PEP005, obtenido de Peplin en lotes de 20 mg, a 4°C. Cuando se requirió, el PEP005 se solubilizó en dimetilsulfóxido (DMSO, >99.9%, Sigma Chemical Company, Dorset, Reino Unido), a una concentración de 10 mg/ml. La solución se mezcló durante 5 minutos o hasta que la solución fue clara y la solución madre de PEP005/DMSO se almacenó a 4°C, donde permaneció estable durante varios meses. Antes de su uso, la solución madre de PEP005/DMSO se eliminó de almacenamiento a 4°C y se calentó a temperatura ambiente. Los volúmenes requeridos de PEP005/DMSO se dividieron en alícuotas en un recipiente de polipropileno y el PEP005/DMSO se diluyó hasta la concentración requerida (por lo general 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml) en medio que contiene suero de fibroblastos (para cultivos de fibroblastos dérmicos, Sección 3.1), con soluciones de PEP005 fresco/medio de cultivo preparadas diariamente, a las diversas concentraciones anteriores, debido a la estabilidad de la solución. Antes de eliminar las soluciones de PEP005/medio de cultivo, se adicionaron a cada solución al menos dos volúmenes de hidróxido de sodio al 0.1% (Sigma Chemical Company), en etanol al 95%/metanol al 5% (ambos de Thermo Fisher Scientific, Leicestershire, Reino Unido) para desactivar.

1.1.3 Evaluación de la síntesis de hialuronano por fibroblastos dérmicos

35 Después de la tripsinización, los fibroblastos dérmicos se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 24 pozos en medio que contiene suero de fibroblastos libre de PEP005 (1 ml), a una densidad celular de 2.5x10<sup>4</sup> células/pozo. Los fibroblastos dérmicos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, durante 48 h, antes de su mantenimiento medio que contiene suero de fibroblastos, libre de suero (1 ml), durante 48 horas adicionales. En esta etapa, medio de cultivo, libre suero se reemplazó con medio que contiene suero de fibroblastos (600 µl), que contiene 0 µg/ml, 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml o 100 µg/ml de PEP005, +/- TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml) (tres pozos de cultivo por concentración de PEP005). También se estableció un control, constituido por células en medio que contiene suero de fibroblastos, libre de suero, que contiene 1% de DMSO. Los fibroblastos dérmicos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, durante 24 h o 72 h, antes de la eliminación del medio de cultivo. Se cuantificó la síntesis de hialuronano en los medios de cultivo recogidos, utilizando un kit de ensayo cuantitativo de ácido hialurónico (Corgenix U.K. Ltd., Cambridgeshire, Reino Unido), que utiliza una proteína de origen natural de unión bovina al hialuronano. Los sobrenadantes se ensayaron, según las instrucciones del fabricante, y la densidad óptica se midió usando un espectrofotómetro a 450 nm. Las concentraciones de hialuronano se determinaron comparando la absorbancia de la muestra con una curva de referencia preparada a partir del blanco reactivo y patrones. Cada experimento se realizó en tres ocasiones distintas.

1.1.4 Evaluación de la formación del recubrimiento pericelular de hialuronano por fibroblastos dérmicos

50 Tras la tripsinización, los fibroblastos dérmicos se sembraron en placas de cultivo de grado bacteriológico de 53 mm (VWR International Ltd., Leicestershire, Reino Unido), en medio que contiene suero de fibroblastos, libre de PEP005 (2 ml), a una densidad de 7x10<sup>4</sup> células/placa. Los fibroblastos dérmicos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, durante la noche, antes del lavado en PBS (2 x 2 ml) y mantenimiento en medio que contiene

5 suero de fibroblastos, libre de suero (2 ml), que contiene 0 µg/ml, 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml o 100 µg/ml de PEP005, +/-TGF-β<sub>1</sub> (tres placas de cultivo por concentración de PEP005). También se estableció un control, constituido por células en medio que contiene suero de fibroblastos, libre de suero, que contiene 1% de DMSO. Los fibroblastos dérmicos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, durante 24 h o 72 h. A las 10 24 h y 72 h, las placas de cultivo se trataron con eritrocitos de sangre de caballo formalizados (TCS Biosciences Ltd., Buckinghamshire, Reino Unido). Los eritrocitos de sangre de caballo formalizados se lavaron en PBS, para eliminar azida de sodio (3 x 20 ml) y se centrifugaron a 100 g/7 min, a 4°C. Las pellas de células de eritrocitos obtenidos se volvieron a suspender en medio que contiene suero de fibroblastos, libre de suero, a una densidad de 1x10<sup>8</sup> células/ml. Se suplementaron alícuotas de la suspensión de células de eritrocitos (500 µl) a cada placa de cultivo y se agitaron las 15 placas, antes de mantenerlos a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, durante 15 min. Las zonas de exclusión de eritrocitos se visualizaron mediante microscopía óptica, utilizando un microscopio invertido Zeiss Axiovert 135 (Carl Zeiss Ltd., Hertfordshire, Reino Unido), con una cámara CCD refrigerada Hamamatsu C5985 (Hamamatsu Photonics UK Ltd., Hertfordshire, Reino Unido) y utilizando Openlab Software 3.0.8 (Improvisation Ltd., Warwickshire, Reino Unido). Cada experimento se realizó en tres ocasiones distintas.

#### 15 1.1.5 Evaluación de la expresión génica de hialuronano sintasa (HAS) por fibroblastos dérmicos

Después de la tripsinización, los fibroblastos dérmicos se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 24 pozos, en medio que contiene suero de fibroblastos, libre de PEP005 (1 ml), a una densidad celular de 2.5x10<sup>4</sup> células/pozo. Los fibroblastos dérmicos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, durante la noche. En esta 20 etapa, se reemplazó el medio de contiene suero de fibroblastos (600 µl), que contiene 0 µg/ml, 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml o 100 µg/ml de PEP005, +/-TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml) (tres pozos de cultivo por concentración de PEP005). También se estableció un control, constituido por células en medio que contiene suero de fibroblastos, que contiene 1% de DMSO. Los fibroblastos dérmicos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, durante 24 h o 72 h, antes del lavado en PBS (3 x 1 ml) y reactivo Trizol® (250 µl), durante 5 min a temperatura ambiente, para inducir la lisis celular. El ARN se extrajo por el método de fenol-cloroformo, como se describió anteriormente, mientras 25 que se generó una biblioteca de ADNc a través de la RT de hexámero aleatoria, como se ha descrito anteriormente. Se adicionó ARN (1 µg) a 100 M de hexámero aleatorio (1 µl), 5x solución reguladora RT (4 µl), 2.5 mM de desoxinucleósido trifosfatos (dNTPs, 5 µl), 2 µl de DTT y agua libre de nucleasa a la reacción (volumen total, 20 µl). Para desnaturalizar el ARN, los tubos de reacción se colocaron en un sistema de PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Cheshire, Reino Unido) y se calentaron durante 5 min/95°C, antes de enfriar a 4°C. Se adicionaron a cada 30 tubo un Superscript (1 µl) y un inhibidor de ribonucleasa RNasin® (1 µl, Promega, Hampshire, Reino Unido) y los tubos se sometieron a 30 ciclos a 20°C durante 10 min, 42°C durante 1 h y 95°C durante 5 min, antes del almacenamiento a 4°C, hasta que se requiera. Como control negativo, también se realizó la RT, con agua libre de nucleasa reemplazando la muestra de ARN.

Se realizó la qPCR, como se ha descrito anteriormente, con la sonda y los cebadores para HAS1, HAS2 y HAS3 (genes 35 diana) y el ARN ribosómico 18s (gen de referencia), diseñado y suministrado por Applied Biosystems. La PCR se realizó en un volumen final de 20 µl/muestra, cada mezcla de reacción consistente en ADNc (1 µl), cebadores de genes diana y sonda (1 µl), mezcla maestra de PCR Taqman® FAST Universal (10 µl, Applied Biosystems) y agua libre de nucleasa (8µl). La amplificación por PCR se realizó usando un ciclo inicial de 95°C durante 1 s, seguido de 40 ciclos de 60°C 40 durante 20 s. También se incluyó un control libre de ADNc. De nuevo, se utilizó el método CT comparativo para la cuantificación relativa de la expresión génica. Cada experimento se realizó en tres ocasiones distintas.

#### 1.1.6 Evaluación del peso molecular de hialuronano *nov*

Se realizó la medición del peso molecular de hialuronano, después de la síntesis de fibroblastos dérmicos, como se describió anteriormente (Meran *et al*, 2008; Simpson *et al*, 2009). Los fibroblastos dérmicos se sembraron en placas de 45 cultivo tisular de 6 pozos, en medio que contiene suero de fibroblastos, libre de PEP005 (2 ml), a 1.5x10<sup>5</sup> células/ pozo. Los fibroblastos dérmicos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, durante 48 h, antes del lavado en solución salina estandarizada con fosfato (PBS, 2x2 ml) y en medio que contiene suero de fibroblastos, libre de suero (2 ml), durante 48 horas más. A las 48 h, el medio que contiene suero de fibroblastos, libre de suero se rellenó con medio que contiene suero libre de suero de fibroblastos (2 ml), medio que contiene suero de fibroblastos, libre de suero (2 ml), que contiene 0 µg/ml, 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml o 100 µg/ml de PEP005, +/-TGF-β<sub>1</sub> (10 50 ng/ml) (tres pozos de cultivo por concentración de PEP005), además de [<sup>3</sup>H]-glucosamina (20 µCi/ml, G.E. Healthcare). Los fibroblastos dérmicos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, durante 24 h o 72 h.

A las 24 h y 72 h, el medio de cultivo se retiró y cada uno se lavó bien en PBS (1x2 ml). El medio de cultivo y los lavados con PBS se agruparon (extractos de medios acondicionados, 8 ml) y se almacenaron a -20°C, hasta que se requiriera. Una vez requeridos, los extractos de medio acondicionados se descongelaron, a 4°C, antes de la adición de un volumen 55 igual de pronasa, solubilizados en solución reguladora Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, que contiene azida de sodio al 0.05% (todos Sigma). Los extractos de medios acondicionados, que contienen pronasa, se incubaron a 37°C durante 24 h, antes de la cromatografía de intercambio iónico en columnas DEAE Sephacel® (G.E. Healthcare), equilibrada con urea 8 M, en solución reguladora BisTris 20 mM, pH 6.0, que contiene 0.2% de Triton X-100 (todos Sigma), para eliminar péptidos de bajo peso molecular y radiomarcador no incorporado. El hialuronano radiomarcado en cada extracto se

5 eluyó a través de columnas de intercambio iónico DEAE Sephacel®, con urea 8M, en solución reguladora BisTris 20 mM, pH 6.0, que contiene Triton X-100 al 0.2% y cloruro de sodio 0.3 M (Sigma). Cada extracto separado se dividió en dos cantidades iguales y el hialuronano radiomarcado precipitó con tres volúmenes de acetato de potasio (1% en etanol al 95%, ambos sigma), en presencia de 4-sulfato de condroitina, heparina y hialuronano no radiomarcado (todos Sigma), como coprecipitantes, a 4°C/18 h.

10 En la precipitación, la primera mitad de cada extracto se resuspendió en solución reguladora de cloruro de guanidinio 4M, pH 6.0, que contiene acetato de sodio 50 mM, Triton X-100 al 0.5% y azida de sodio al 0.05% (todos Sigma), antes de la valoración del peso molecular de hialuronano, a través de una columna Sephacryl® S-500 previamente calibrada (G.E. Healthcare). La columna se calibró con clorhidrato de [3H] glucosamina, Mr 215; [35S] sulfato de condroitina glicosamino-glicanos, Mr 25,000; decorina, Mr 100,000 y [35S] versican, Mr 1,300,000. La elución se realizó con solución reguladora de cloruro de guanidinio 4 M, pH 6.0, que contiene acetato de sodio 50 mM, Triton X-100 al 0.5% y azida de sodio al 0.05%. Para confirmar que los perfiles de cromatografía obtenidos fueron el resultado de hialuronano radiomarcado solo, la segunda mitad de cada extracto se digirió con hialuronidasa (200 µl, *Streptomyces hyalurolyticus*, ICN Pharmaceuticals), en solución reguladora de acetato de sodio 20 mM, pH 6.0, que contiene cloruro de sodio 0.15M y 0.05% de azida de sodio, a 37°C/18 h. Estas muestras digeridas se mezclaron con un volumen igual (200 µl) de solución reguladora de cloruro de guanidinio 4 M, pH 6.0, que contiene acetato de sodio 50 mM, Triton X-100 al 0.5% y azida de sodio al 0.05%, seguido de la elución de la columna Sephacel® S-500.

20 Se transfirieron alícuotas (20 µl x 3) de cada fracción de extracto a viales de centelleo, seguido de la adición de etanol al 70% (600 µl) y líquido de centelleo (4 ml). Los viales de centelleo se sometieron a vortex y se cuantificó la incorporación de [3H] utilizando un analizador de líquido de centelleo Packard Tri-Carb 1900CA (Perkin Elmer), con valores obtenidos expresados como desintegraciones por minuto (dpm). Para obtener cada perfil de cromatografía, la actividad de [3H] de ambas mitades de cada extracto se normalizó y se corrigió la dilución, antes de restar los recuentos resistentes a la hialuronidasa. Como tal, los perfiles de cromatografía representan solamente la actividad sensible a hialuronidasa en cada uno de los tratamientos tratados con PEP005 (0 µg/ml, 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml o 100 µg/ml de PEP005, +/-TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), con los datos presentados como actividad de [3H] por fracción, frente al número de fracción. Cada experimento se realizó en dos ocasiones distintas.

## 1.2 Clínica

### 1.2.1 Estudio de caso del potencial cosmético de gel PEP005 sobre la piel humana

30 El día 1 (referencia) y después del consentimiento informado, se realizó una breve historia médica y un examen físico para confirmar la elegibilidad del sujeto en este estudio. Se registró la historia clínica y se realizó un breve examen médico. Se marcó una zona de 50 cm<sup>2</sup> de la piel en un lado de la cara y se designó como zona de tratamiento. Se registraron fotografías basales utilizando TruVu® y las mediciones de referencia. Se aplicó entonces gel PEP005 (ingenol mebutato), 0.005% (Peplin Inc.) a la cara para cubrir los 50 cm<sup>2</sup> de tratamiento.

35 El sujeto regresó a la clínica al día siguiente (día 2). Se tomaron fotografías (incluyendo TruVu®) y se tomaron medidas de la zona de aplicación. Se recolectaron reacciones cutáneas basadas en el informe de los sujetos y en las observaciones del investigador. Se aplicó una segunda aplicación de gel PEP005, 0.005% a la zona de tratamiento.

40 El sujeto regresó a la clínica los días 8, 15 y 30 para fotografías (incluyendo TruVu®), mediciones y evaluación de reacciones cutáneas. Las evaluaciones globales del médico se completaron en la visita los días 15 y 30. La evaluación global del médico utilizó una escala de 7 puntos, -3 a +3; -3 = notablemente peor, -2 = moderadamente peor, -1 = ligeramente peor, 0 = sin cambios, +1 ligeramente mejor, +2 = moderadamente mejor y +3 = marcadamente mejor. El sujeto salió del estudio en la visita del día 30.

### 1.2.2 Fotografía TruVu®

45 El sistema de fotografía TruVu® (Johnson & Johnson Consumer Companies, Inc.) captura imágenes de piel usando varios tipos de luz diferentes. Los siguientes tipos de luz diferentes se utilizaron para este estudio; luz visible, luz de polarización paralela, luz polarizada cruzada y luz UV. Estos cuatro diferentes tipos de luz han demostrado revelar la apariencia natural de la piel, líneas finas y arrugas, enrojecimiento y envejecimiento UV. Los resultados son generados por computadora en unidades arbitrarias que van desde "ninguno/bajo" a "moderado" a "elevado/alto" y finalmente se representan como gráficos de barras para líneas finas, arrugas, enrojecimiento y envejecimiento UV. Estos datos se transponen manualmente a un número entero de '0' (ninguno/bajo) a '5' (moderado) a '10' (elevado/alto) por el médico.

## 50 2. Resultados

### 2.1 Evaluación de la síntesis de hialuronano por fibroblastos dérmicos

Los valores promedio obtenidos para la cuantificación de la síntesis de hialuronano, por fibroblastos dérmicos, en presencia de PEP005 (0.01-100 µg/ml), en ausencia y presencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), a 24 h y 72 h, cuantificados usando un Kit de ensayo cuantitativo de ácido hialurónico, se muestran en las figuras 1A y 1B, respectivamente.

5 Los niveles promedio de hialuronano (ng/ml), sintetizado por fibroblastos dérmicos, a las 24 h, en ausencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), demostraron que el PEP005 tenía un efecto estimulador significativo sobre la síntesis de hialuronano, A concentraciones de 0.01-10 µg/ml, en comparación con los controles de fibroblastos dérmicos no tratados (Figura 1A). La introducción de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), en ausencia de PEP005, indujo una ligera estimulación de la síntesis de hialuronano, a las 24 h, mientras que la presencia tanto de PEP005 como de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml) parecía ejercer un efecto sinérgico significativo sobre la síntesis de hialuronano, como se observó por la mejora de la síntesis de hialuronano, en comparación con los controles fibroblásticos dérmicos no tratados y con los fibroblastos dérmicos, en presencia de PEP005 (0.01-100 µg/ml), pero en ausencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml, Figura 1A).

10 Como a las 24 h, los niveles promedio de hialuronano (ng/ml), sintetizado por fibroblastos dérmicos, a 72 h, en ausencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), demostraron que el PEP005 continuaba ejerciendo un efecto estimulador, significativo sobre la síntesis de hialuronano, a concentraciones de 0.01-10 µg/ml, en comparación con los controles de fibroblastos dérmicos no tratados (Figura 1B).

15 Se demostró adicionalmente que los efectos de PEP005 sobre la síntesis de hialuronano, a todas las concentraciones (0.01-100 µg/ml), se debían únicamente al PEP005 solo, y no al DMSO usado para la solubilización del PEP005, ya que los cultivos de fibroblastos dérmicos en presencia de DMSO al 1%, no mostraron diferencias significativas en la síntesis de hialuronano, en comparación con los controles de fibroblastos dérmicos no tratados (p > 0.05, datos no mostrados).

## 20 2.2 Evaluación de la formación del recubrimiento pericelular de hialuronano por fibroblastos dérmicos

Las imágenes digitales representativas obtenidas de la formación de recubrimientos pericelulares de hialuronano, por fibroblastos dérmicos, en presencia de PEP005 (0.01-100 µg/ml), en ausencia de TGF-β<sub>1</sub>, a las 24 h y 72 h, según se determinó usando un ensayo de exclusión de partículas, se muestran en las figuras 2 y 3, respectivamente. Las imágenes digitales representativas obtenidas de la formación de recubrimientos pericelulares de hialuronano, por fibroblastos dérmicos, en presencia de PEP005 (0.01-100 µg/ml) y TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), a las 24 h y 72 h, se muestran en las figuras 4 y 5, respectivamente.

25 En general, el análisis de la formación de recubrimiento pericelular de hialuronano, a las 24 h, en ausencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), reveló que había poca formación de recubrimiento pericelular, a las 24 h, en ya sea el control libre de PEP005 o en cultivos tratados con PEP005 (flecha, Figura 2). Por el contrario, a las 72 h, el PEP005 parecía aumentar el tamaño del recubrimiento pericelular en muestras tratadas con PEP005, a concentraciones de 0.01-10 µg/ml, en comparación con los controles libres de PEP005 (flecha, Figura 3). Adicionalmente, los cambios morfológicos en el fibroblasto tratado con PEP005 (0.01-10 µg/ml) fueron consistentes con la presencia de miofibroblastos, debido a la diferenciación de fibroblastos.

30 La introducción de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), en ausencia de PEP005, indujo un ligero aumento en la formación de recubrimiento pericelular de hialuronano, a las 24 h, mientras que la presencia tanto de PEP005 como de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), parece ejercer un efecto sinérgico mayor sobre la formación del recubrimiento pericelular de hialuronano, evidente por el aumento dramático de la formación de recubrimiento pericelular (debido a la acumulación de hialuronano), a las 24 h, en comparación con los controles fibroblásticos dérmicos no tratados y con los fibroblastos dérmicos, en presencia de PEP005 (0.01-10 µg/ml), pero en ausencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml, flecha, Figura 4).

35 La formación mejorada de recubrimiento pericelular de hialuronano, a las 24 h, en presencia tanto de PEP005 como de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), se mejoró aún más a las 72 h, a concentraciones de PEP005 de 0.01-10 µg/ml, en comparación con controles libres de PEP005 (flecha, Figura 5). Los cambios principales en la morfología celular evidente fueron consistentes con la presencia de miofibroblastos.

40 Se demostró adicionalmente que los efectos de PEP005 sobre la formación de recubrimiento pericelular de hialuronano, a todas las concentraciones (0.01-100 µg/ml), se debían únicamente a PEP005 solo, y no al DMSO usado para la solubilización de PEP005, ya que cultivos de fibroblastos dérmicos en presencia de DMSO al 1%, no mostró diferencias obvias en la formación de recubrimiento pericelular de hialuronano, en comparación con los controles de fibroblastos dérmicos no tratados (datos no mostrados).

## 45 2.3 Evaluación de la expresión génica de hialuronano sintasa (HAS) por fibroblastos dérmicos

50 Los valores promedio obtenidos para la expresión de HAS1, HAS2 y HAS3, por fibroblastos dérmicos, en presencia de PEP005 (0.01-100 µg/ml), en ausencia y presencia de TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml), a las 24 h y 72 h, cuantificados por qPCR, se muestran en las figuras 6, 7 y 8, respectivamente.

Los valores promedio de  $\Delta\Delta\text{CT}$  obtenidos para HAS1, demostraron que la expresión de HAS1 por fibroblastos dérmicos, a las 24 h, en ausencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), era extremadamente baja ( $\Delta\Delta\text{CT} < 0.5$ , Figura 6). Por lo tanto, como virtualmente ninguna expresión de HAS1 era evidente, PEP005 no indujo efectos obvios sobre la expresión de HAS1, en ausencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml). Por el contrario, la introducción de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), en ausencia de PEP005, indujo un aumento importante en la expresión de nHAS1, en comparación con el control de fibroblastos dérmicos ( $p < 0.001$ , Figura 6). En presencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) y PEP005 (0.01-100  $\mu\text{g/ml}$ ), se observó una inhibición general de la expresión de HAS1 ( $p < 0.05$  a 0.01  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0.01$  a 100  $\mu\text{g/ml}$ ).

Los valores promedio de  $\Delta\Delta\text{CT}$  obtenidos para HAS1 demostraron que la expresión de HAS1 por fibroblastos dérmicos, a 72 h, en ausencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), era de nuevo relativamente baja ( $\Delta\Delta\text{CT} < 1.0$ , Figura 6), de modo que PEP005 no indujo efectos obvios sobre la expresión de HAS2, en ausencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml). Por el contrario, la introducción de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), en ausencia de PEP005, de nuevo indujo un aumento de la expresión de HAS1, en comparación con el control de los fibroblastos dérmicos (Figura 6). En presencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) y PEP005 (0.01-100  $\mu\text{g/ml}$ ), PEP005 indujo una inhibición general en la expresión de HAS1, en todas las concentraciones de PEP005 (0.01-100  $\mu\text{g/ml}$ , Figura 6). Sin embargo, la inhibición de la expresión del gen HAS1 observada con PEP005 y TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), a las 72 h, se consideró no significativa ( $p > 0.05$ ).

Los valores promedio de  $\Delta\Delta\text{CT}$  obtenidos para HAS2, demostraron que la expresión de HAS2 por fibroblastos dérmicos, a las 24 h, en ausencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), era también relativamente baja ( $\Delta\Delta\text{CT} < 1.0$ , Figura 7). Se demostró además que el PEP005 tenía un efecto estimulante sobre la expresión de HAS2 en fibroblastos dérmicos, a concentraciones de 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$ , en ausencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), en comparación con los controles de fibroblastos dérmicos no tratados, aunque el aumento de la expresión del gen HAS2 observado con PEP005, a las 24 h, se consideró que no es significativo ( $p > 0.05$ ). La introducción de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), en ausencia de PEP005, tuvo poco efecto sobre la expresión de HAS2 en fibroblastos dérmicos, a las 24 h, como se estableció previamente (Meran et al, 2006, 2007). PEP005 también indujo el aumento de expresión de HAS2 en fibroblastos dérmicos, a concentraciones de 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$ , en presencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), en comparación con los controles no tratados de fibroblastos dérmicos. Sin embargo, el aumento de expresión de gen HAS2 también se consideró no significativo ( $p > 0.05$ ).

Los valores promedio de  $\Delta\Delta\text{CT}$  obtenidos para HAS2, demostraron que la expresión de HAS2 por fibroblastos dérmicos, a 72 h, en ausencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), era de nuevo relativamente baja ( $\Delta\Delta\text{CT} < 1.0$ , Figura 8). Sin embargo, se demostró que el PEP005 estimulaba un aumento importante en la expresión del gen HAS2 a concentraciones de 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 8). Sin embargo, se observó que el aumento del gen HAS2 observada a concentraciones de 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$  no era significativa ( $p > 0.05$ ). La introducción de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), en ausencia de PEP005, indujo sorprendentemente efectos mínimos sobre la expresión de HAS2, en comparación con fibroblastos dérmicos de control ( $p > 0.05$ , Figura 8). Sin embargo, en presencia de ambos TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) y PEP005 (0.01-100  $\mu\text{g/ml}$ ), PEP005 indujo una inhibición general de la expresión del gen HAS2, en todas las concentraciones de PEP005 (0.01-100  $\mu\text{g/ml}$ , Figura 8). Sin embargo, inhibición de la expresión del gen HAS2 observada con PEP005 y TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), a las 72 h, se consideró no significativa ( $p > 0.05$ ), en comparación con los controles de fibroblastos dérmicos libres de PEP005.

Los valores promedio de  $\Delta\Delta\text{CT}$  obtenidos para HAS3, demostraron que la expresión de HAS3 por fibroblastos dérmicos, a las 24 h, en ausencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), era también relativamente baja ( $\Delta\Delta\text{CT} < 1.0$ , Figura 8). Se demostró además que el PEP005 abolió completamente la expresión de HAS3 en fibroblastos dérmicos, en todas las concentraciones de PEP005 (0.01-100  $\mu\text{g/ml}$ ), en comparación con los controles de fibroblastos dérmicos no tratados (Figura 8), aunque debido a los niveles relativamente bajos de expresión de HAS3 en general, se observó que la inhibición de la expresión del gen HAS3 observada no era significativa ( $p > 0.05$ ). La introducción de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), en ausencia de PEP005, también tuvo un efecto inhibidor sobre la expresión de HAS3 en fibroblastos dérmicos, a las 24 h, en comparación con fibroblastos dérmicos, en ausencia de ambos PEP005 (0.01- 100  $\mu\text{g/ml}$ ) y TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) ( $p < 0.01$ , Figura 8). PEP005 también indujo la inhibición de la expresión de HAS3 en fibroblastos dérmicos a niveles apenas detectables, a concentraciones de 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$ , en presencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), en comparación con los controles de fibroblastos dérmicos no tratados. Sin embargo, se volvió a considerar que la inhibición de la expresión del gen HAS3 no era significativa a todas las concentraciones de PEP005 (0.01-100  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p > 0.05$ ).

Los valores promedio de  $\Delta\Delta\text{CT}$  obtenidos para HAS3, demostraron que la expresión de HAS3 por fibroblastos dérmicos, a 72 h, en ausencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), era de nuevo relativamente baja ( $\Delta\Delta\text{CT} < 1.0$ , Figura 8). Sin embargo, se demostró que el PEP005 estimulaba el aumento en la expresión del gen HAS3, en ausencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), a concentraciones de 1-10  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 8), a niveles mayores que la expresión del gen HAS3 observada a las 24 h (Figura 8). Sin embargo, el HAS3 gen up-regulación se consideró no significativo a estas concentraciones de PEP005 ( $p > 0.05$ ). La introducción de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), en ausencia de PEP005, tuvo de nuevo un efecto inhibidor sobre la expresión de HAS3 en fibroblastos dérmicos, a las 72 h, en comparación con los fibroblastos dérmicos de control. Dado los niveles prácticamente despreciables de expresión de HAS3 a las 72 h, en presencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), se demostró que el PEP005 no presentaba efectos significativos sobre la expresión de HAS3 en fibroblastos dérmicos ( $p > 0.05$ ), en presencia de TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml), a 72 h, a todas las concentraciones de PEP005 examinadas (0.01-100  $\mu\text{g/ml}$ , Figura 8).

2.5 Evaluación del efecto del gel PEP005, 0.005% en las líneas finas, arrugas, enrojecimiento y envejecimiento UV usando TruVu® en la piel humana

5 Después de dos aplicaciones diarias en los días 1 y 2 con gel PEP005, 0.005% a una zona de 50 cm<sup>2</sup> de piel en la cara se evaluó el nivel de líneas finas, arrugas, enrojecimiento y envejecimiento UV al día 30 y en comparación con niveles que fueron evaluados antes de la aplicación (referencia) para un sujeto. Se demostró que para este sujeto el nivel de líneas finas se redujo de 10 a 4, las arrugas disminuyeron de 8 a 5, el enrojecimiento no fue afectado y el envejecimiento por UV se redujo de 2 a 1. La evaluación global del médico para este sujeto fue clasificada como +2 o moderadamente mejor, indicando que globalmente las dos aplicaciones de gel PEP005, 0.005% dieron lugar a una "moderadamente mejor" evaluación cosmética global del sujeto (en la zona de piel tratada) al día 30 en comparación con la referencia (Tabla 2.5-1).

Tabla 2.5-1

	Referencia	Día 30
Condición de la piel	Puntuación	
Líneas finas	10	4
Arrugas	8	5
Enrojecimiento	2	2
Envejecimiento UV	2	1
Evaluación global del médico	NA	+2

2.6 Valoración del peso molecular de hialuronano *novo*

15 Los valores promedio para la incorporación de [3H]-Glucosamina en presencia de 0, 0.01, 0.1, 1.0 y 10 µg/ml de PEP005, en presencia o ausencia de TGF-β<sub>1</sub>, se presentan en las figuras 9-12.

El hialuronano sintetizado en presencia de PEP005 fue predominantemente de peso molecular alto (> 1.5x10<sup>6</sup> Da) y medio (<1.5x10<sup>6</sup> - 4x10<sup>5</sup> Da), con los datos del día 3 demostrando la síntesis adicional de hialuronano. Se postula que el hialuronano de peso molecular medio y bajo observado se debe a la degradación del hialuronano. La extensión global de la degradación del hialuronano se reduce cuando los fibroblastos se incuban en presencia de TGF-β<sub>1</sub>.

20 Referencias

Asari, A., et al., J. Histochem. Cytochem., 1992, 40: 1693-1704

Baumann, L., J Pathol., 2007, 211: 241-251

Bertheim, U., et al., British Journal of Plastic Surgery, 2004, 57: 429-439

Bertheim, U. and Hellström, S., British Journal of Plastic Surgery, 1994, 47: 483-489

25 Cook H. et al., J Invest Dermatol 2000; 115: 225-33

Helfrich, Y.R, Sachs, D.L. and Vorhees, J.J, Dermatology Nursing, 2008; 20:177-183

Meran, S. et al., J. Biol. Chem., 2007, 282: 25687-25697

Meran, S. et al., J. Biol. Chem., 2008, 283: 6530-6545

Simpson, R.M. et al., Am. J. Pathol., 2009, 175: 1915-1928

30 Stephens P. et al., Exp Cell Res 2003; 283: 22-35

Stephens P. et al., Br J Dermatol 2001; 144: 229-237

Stem R., and Maibach, H.I., Clin. Dermatol., 2008, 26: 106-122

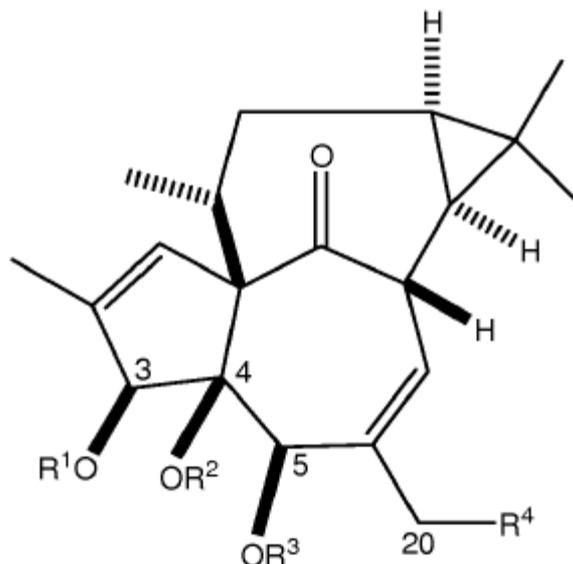
Tanino et al., J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, 1498-1500

Winkler et al., J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 9726

Zanna, G. et al., Veterinary Dermatology 2008, 19: 314-318

## REIVINDICACIONES

1. Un método para el tratamiento cosmético de piel no enferma cronológicamente envejecida y/o fotoenvejecida en un sujeto, que comprende administrar a la piel de dicho sujeto un compuesto ingenol aislado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto ingenol tiene la fórmula:



5

en la que

$R^1$  se selecciona entre alquilo opcionalmente sustituido, alqueniilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, acilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido,  $S(O)_2R'$ ,  $S(O)_2OR'$ ,  $P(O)(OR')_2$  (en las que  $R'$  es hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo, acilo, arilo, o arilalquilo) y glicosilo y

10  $R^2$ - $R^3$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueniilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, acilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido,  $S(O)_2R'$ ,  $S(O)_2OR'$ ,  $P(O)(OR')_2$  (en las que  $R'$  es hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo, acilo, arilo, o arilalquilo) y glicosilo o  $R^1$  y  $R^2$  o  $R^2$  y  $R^3$  pueden formar una cadena de metileno o etileno; y

15  $R^4$  se selecciona entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoxi opcionalmente sustituido, alquinoxi opcionalmente sustituido, aciloxi opcionalmente sustituido, arilalcoxi opcionalmente sustituido,  $OS(O)_2R'$ ,  $OS(O)_2OR'$ ,  $OP(O)(OR')_2$  (en los que  $R'$  es hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo, acilo, arilo, o arilalquilo) y glicosilo,

20 en la que los sustituyentes opcionales para alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, arilo y de este modo acilo, incluyen: halo(cloro, bromo, yodo y flúor), hidroxilo, alcoxi, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo  $C_{3-6}$ , fenilo, nitro, halometilo (por ejemplo, tribromometilo, triclorometilo, trifluorometilo), halometoxi (por ejemplo, trifluorometoxi, tribromometoxi),  $C(O)$ alquilo  $C_{1-6}$ , amino( $NH_2$ ), alquilamino  $C_{1-6}$ , (por ejemplo, metilamino, etilamino y propilamino) dialquilamino  $C_{1-6}$  (por ejemplo, dimetilamino, dietilamino y dipropilamino),  $CO_2H$ ,  $CO_2$ alquilo  $C_{1-6}$ , tio( $SH$ ) y alquiltio  $C_{1-6}$ , e incluye la sustitución de un grupo  $CH_2$  por un grupo carbonilo ( $C=O$ ) o puede ser un grupo metileno o etileno dioxo.

2. El método según la reivindicación 1, en el que  $R^1$  es un grupo angelilo.

25 3. El método según la reivindicación 2 en el que el compuesto ingenol se selecciona del grupo que consiste en ingenol-3-angelato, 20-O-acetil-ingenol-3-angelato y 20-desoxi-ingenol-3-angelato.

4. El método según la reivindicación 3, en el que el compuesto ingenol es ingenol-3-angelato.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto ingenol se administra a una zona de la piel de al menos  $10\text{ cm}^2$ .

30 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto ingenol se administra a la cara y/o cuello y/o garganta y/o zona alrededor de los ojos.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto ingenol se administra por vía tópica a la piel.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el compuesto ingenol se administra en la forma de un gel a base de alcohol isopropílico o una crema de éter de macrocetilo.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el tratamiento es para mejorar la apariencia cosmética de líneas finas y/o envejecimiento por UV.

Figura 1A

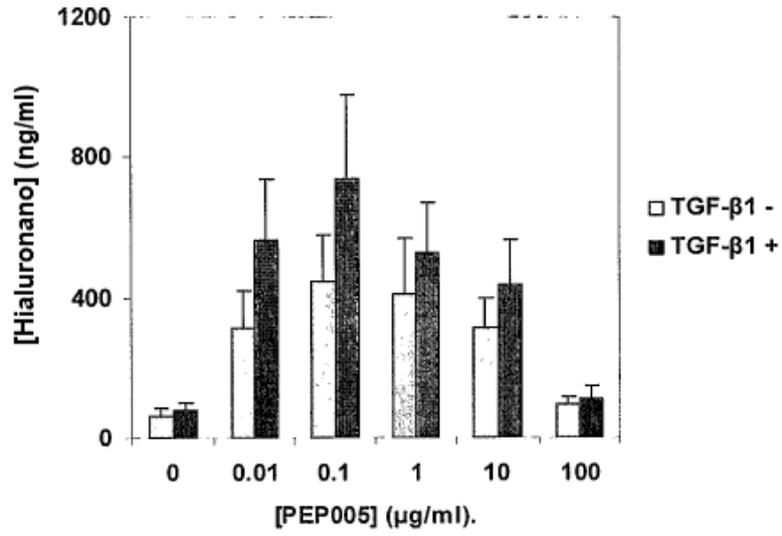


Figura 1B

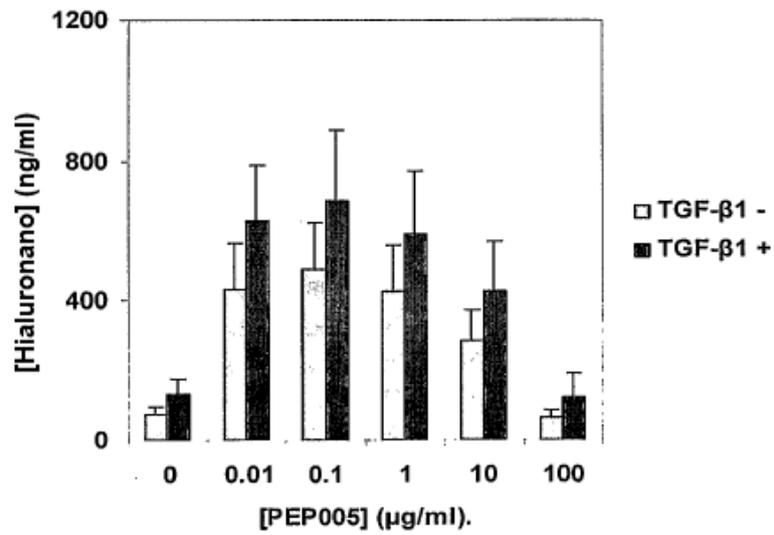


Figura 2

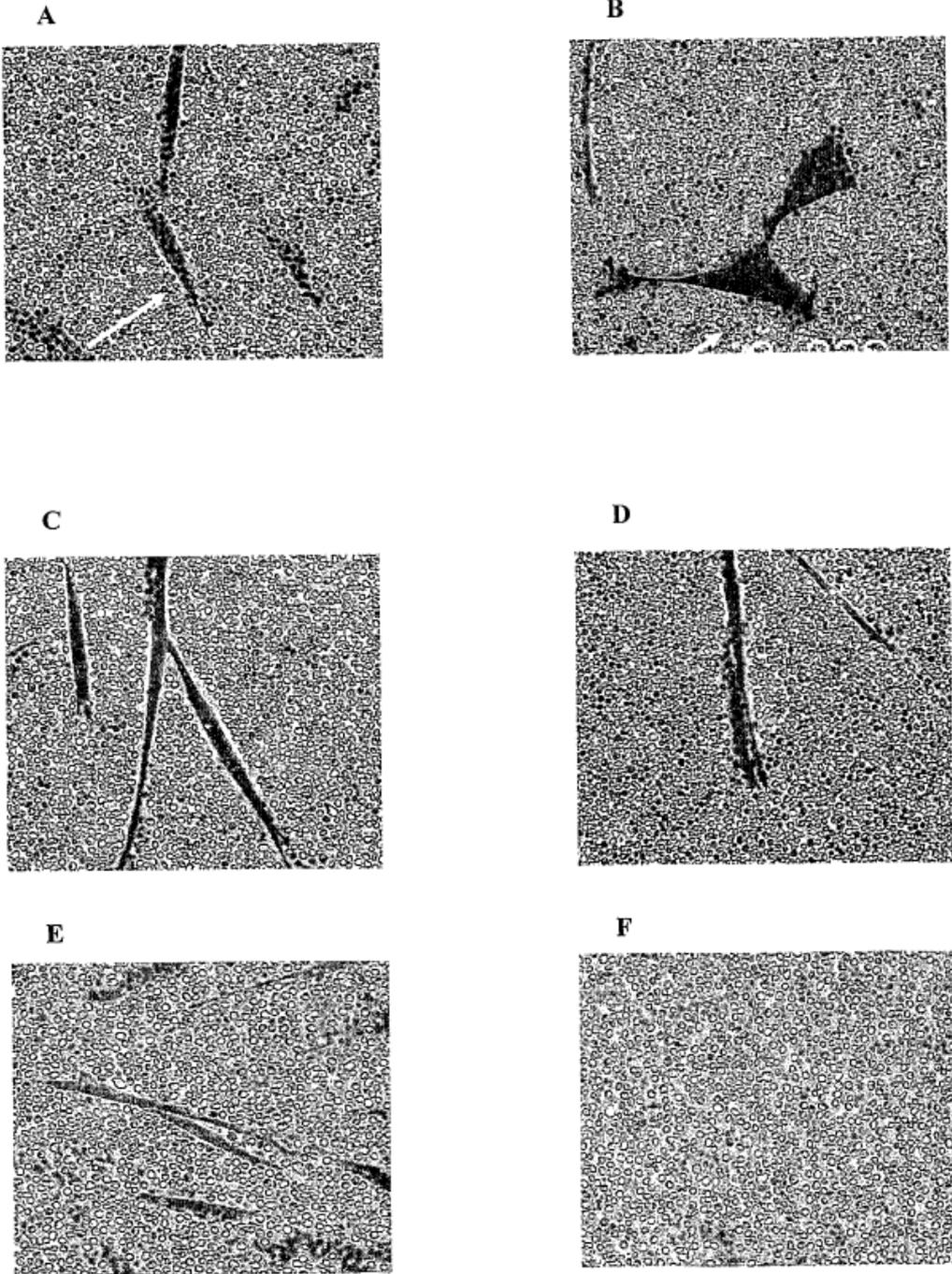


Figura 3

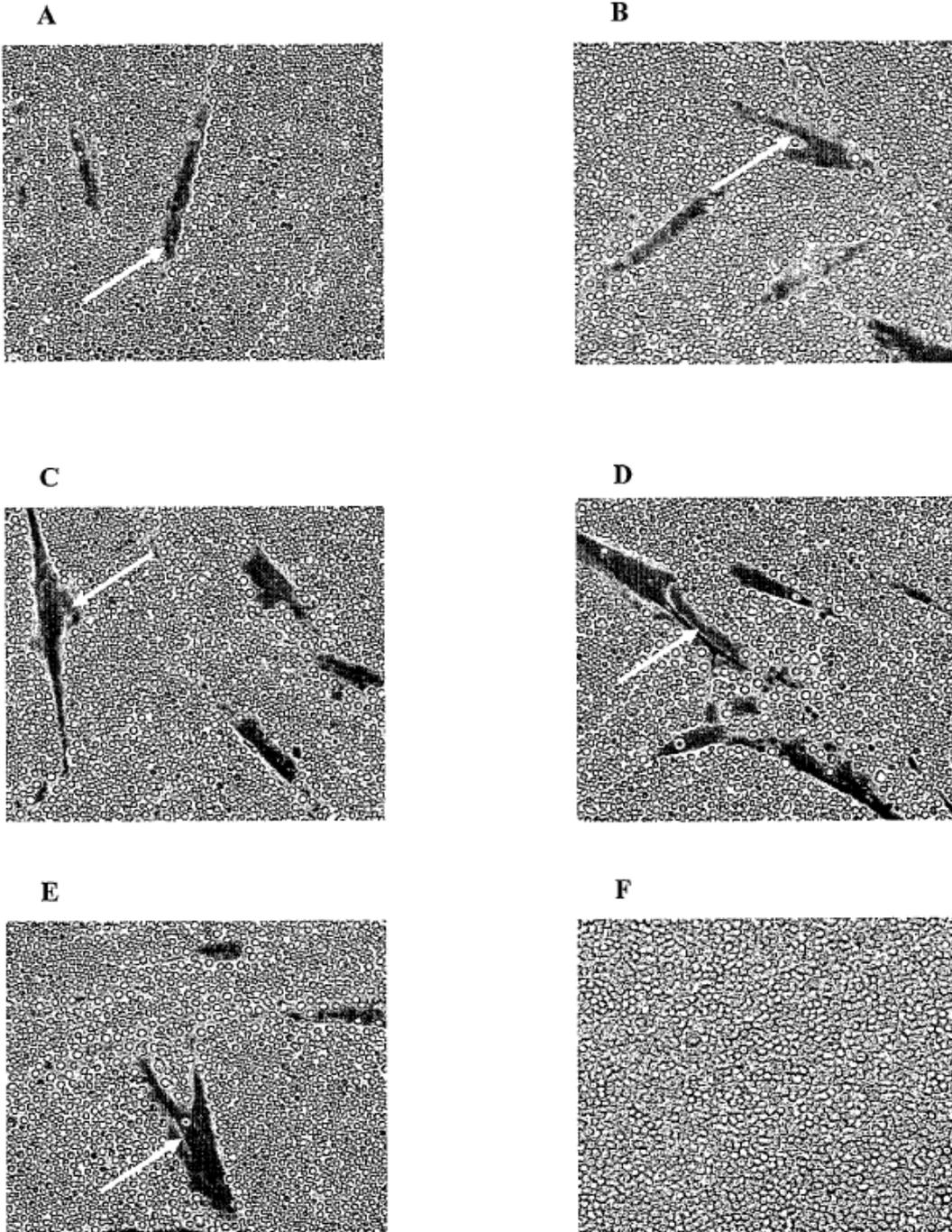


Figura 4

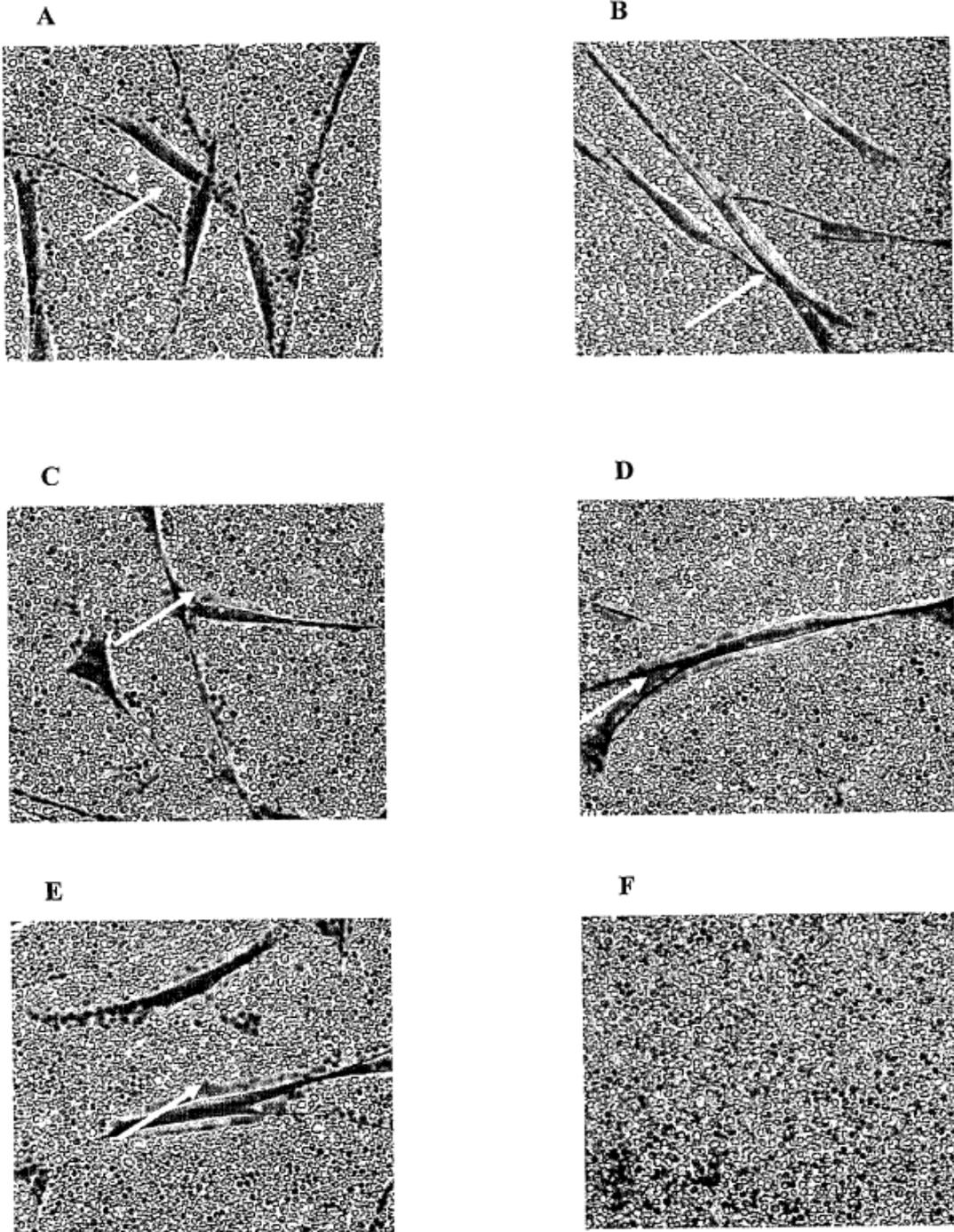


Figura 5

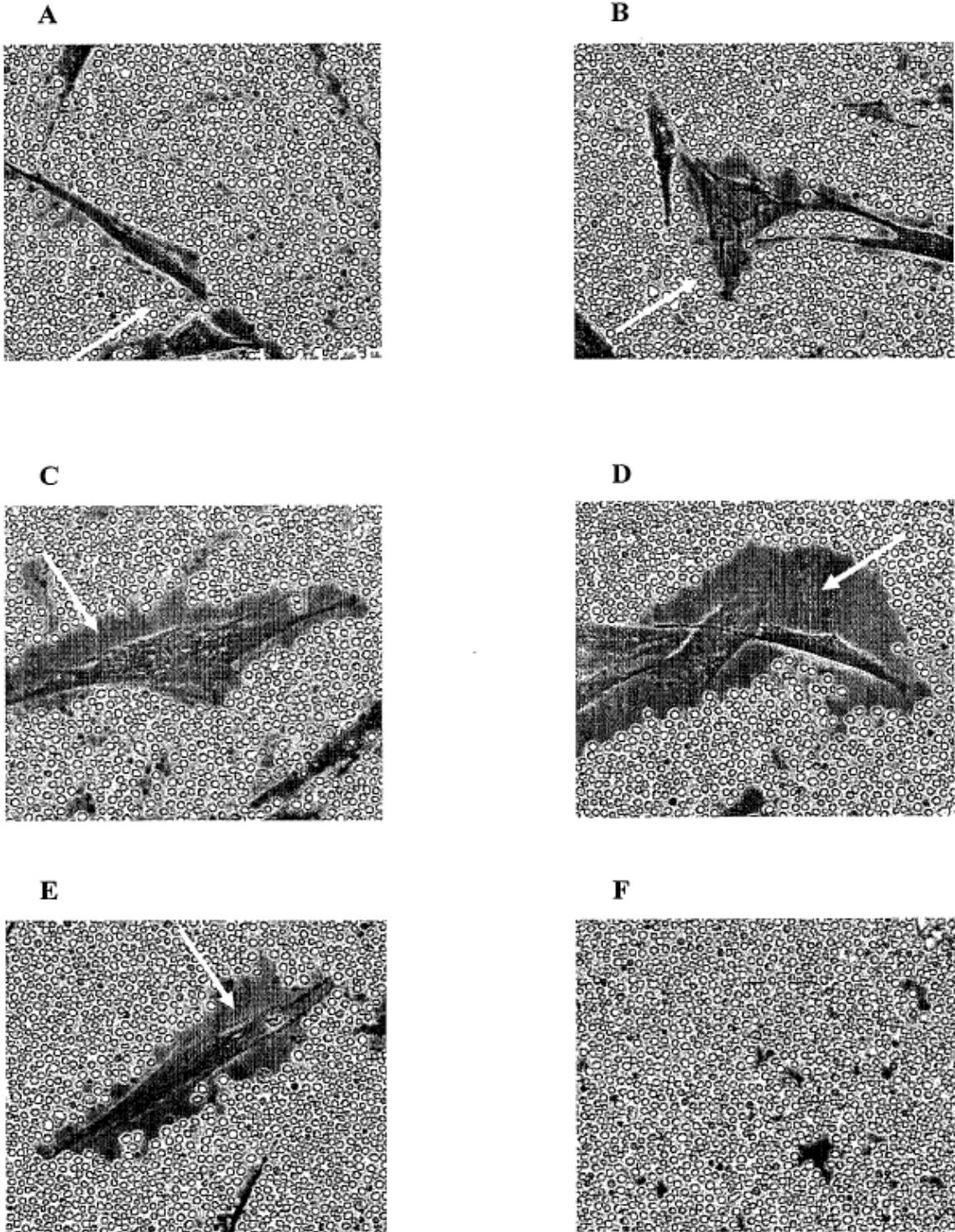
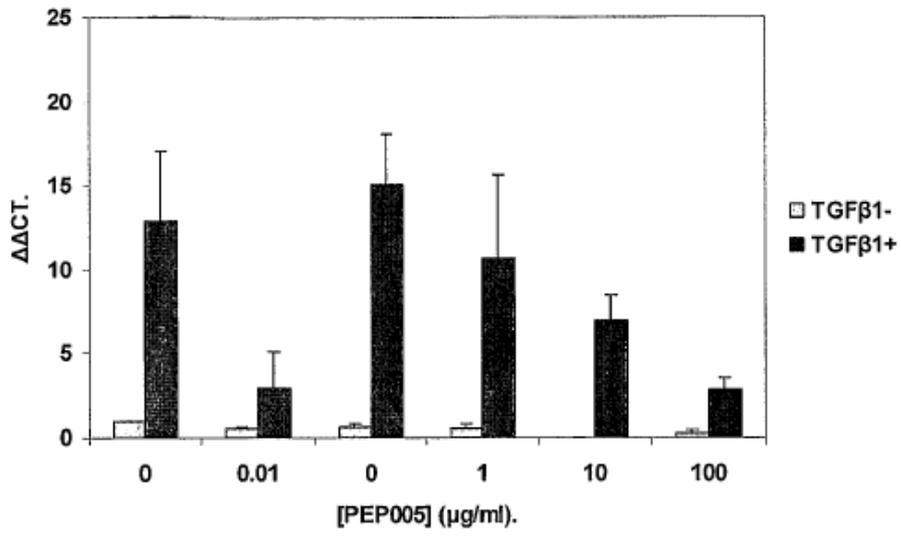


Figura 6



A

B

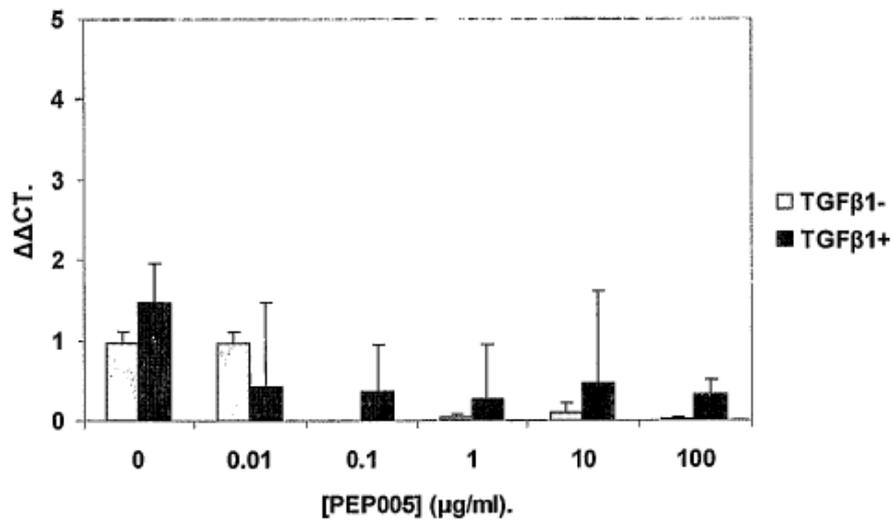
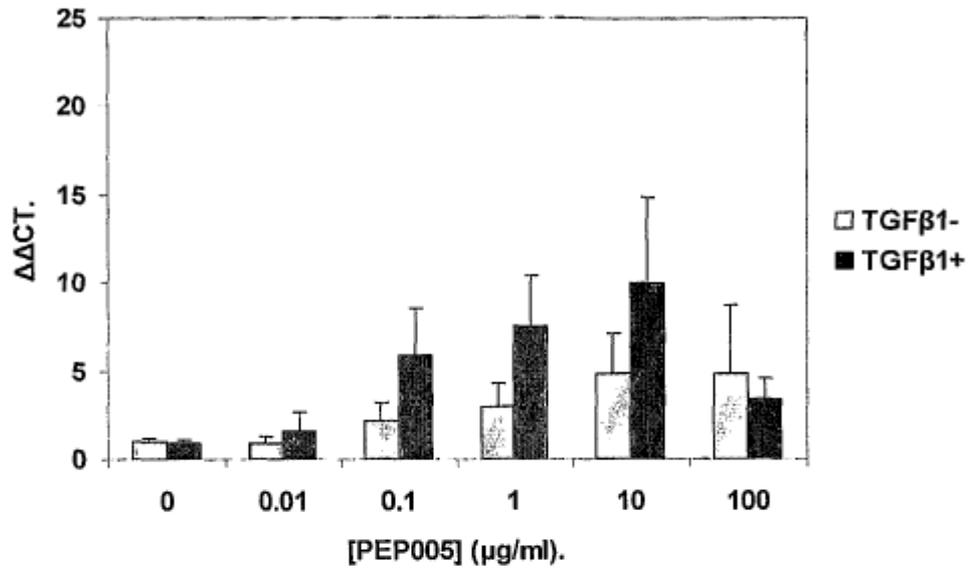


Figura 7

A



B

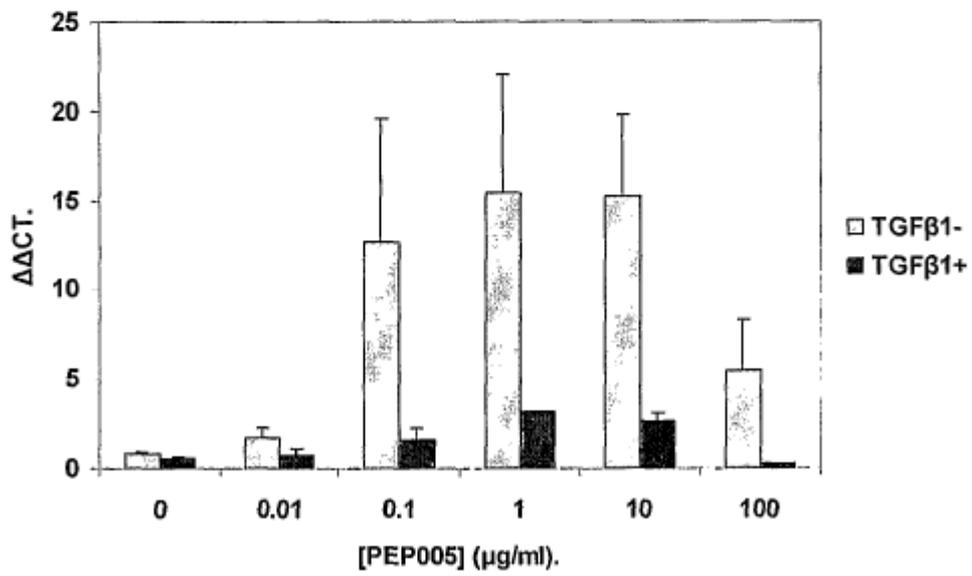
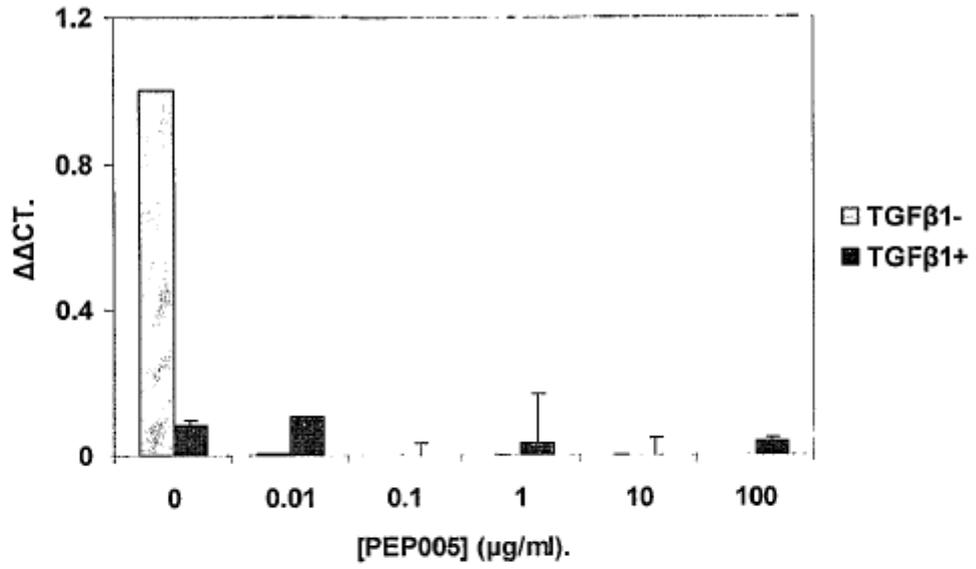


Figura 8

A



B

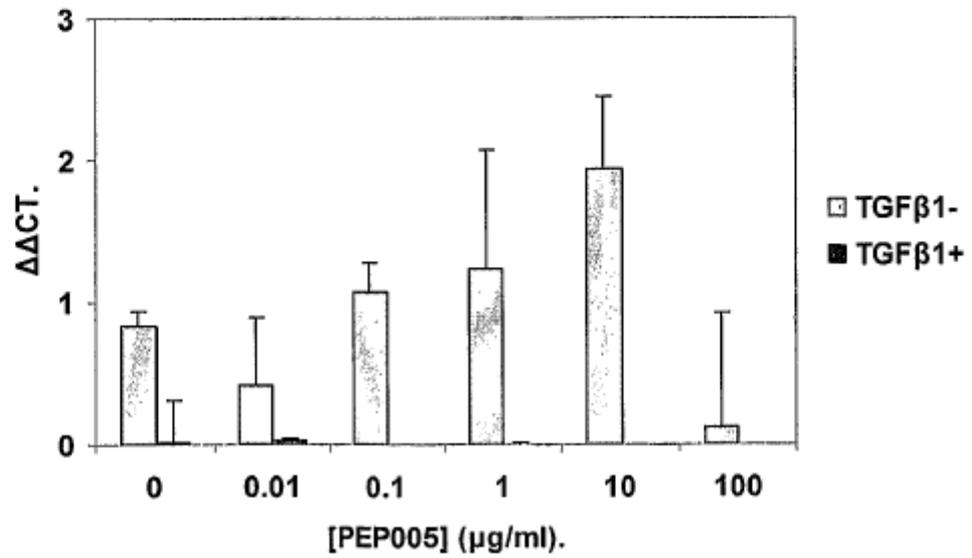


Figura 9

Evaluación del tamaño molecular de hialuronano novo en fibroblastos tratados con PEP005, - TGF- $\beta_1$

Día 1.

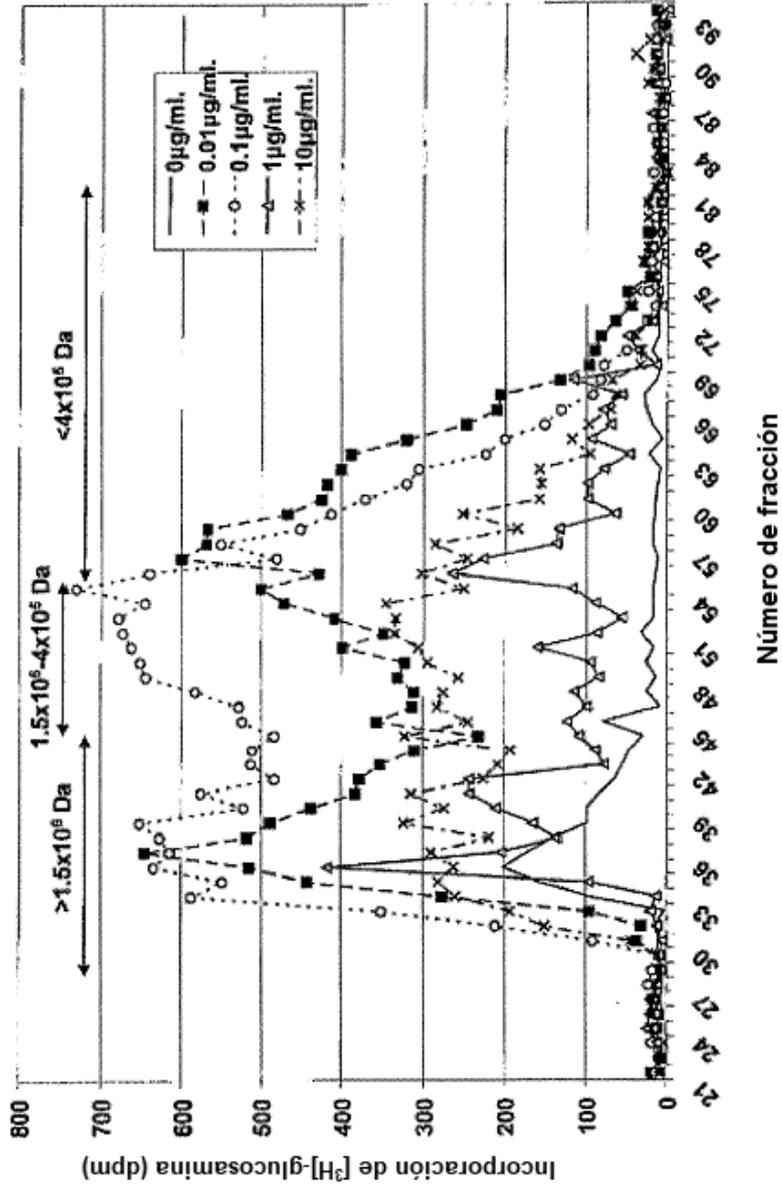
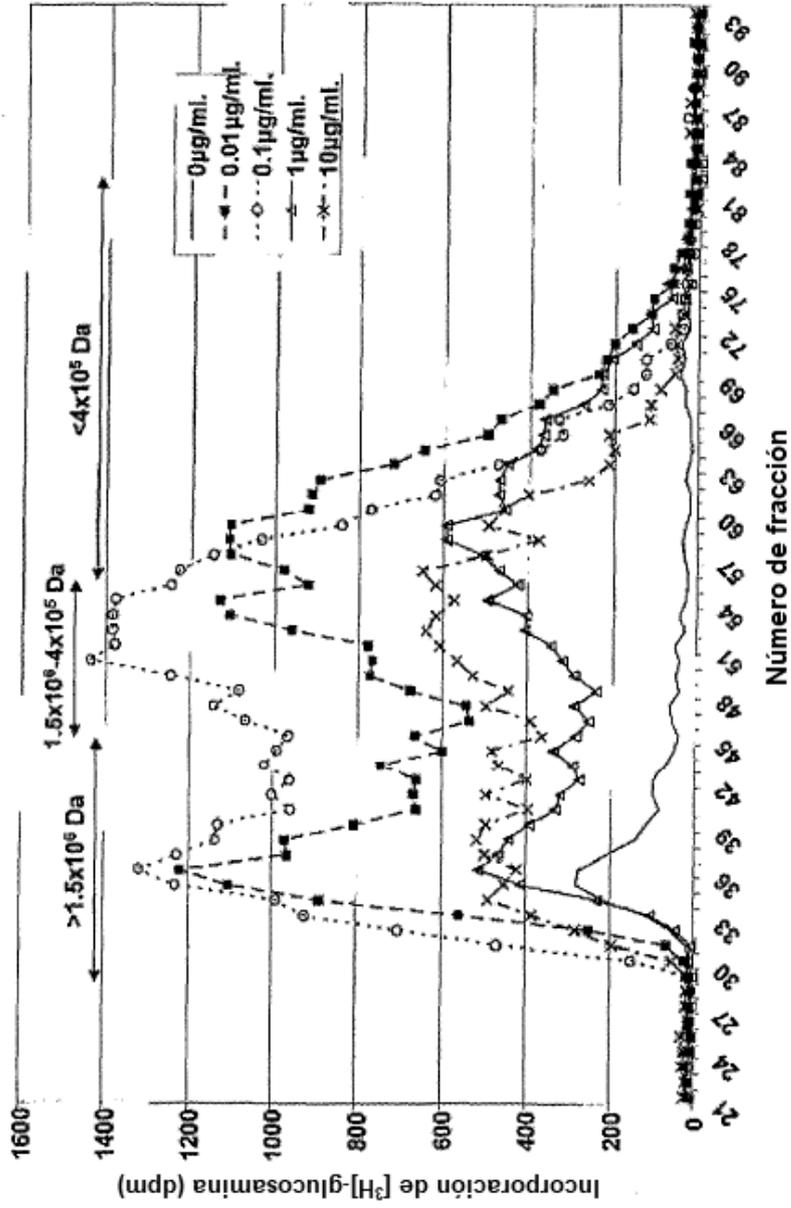


Figura 10

Evaluación del tamaño molecular de hialuronano *novo* en fibroblastos tratados con PEP005, - TGF- $\beta_1$

Día 3.



Evaluación del tamaño molecular de hialuronano *novo* en fibroblastos tratados con PEP005, + TGF- $\beta_1$

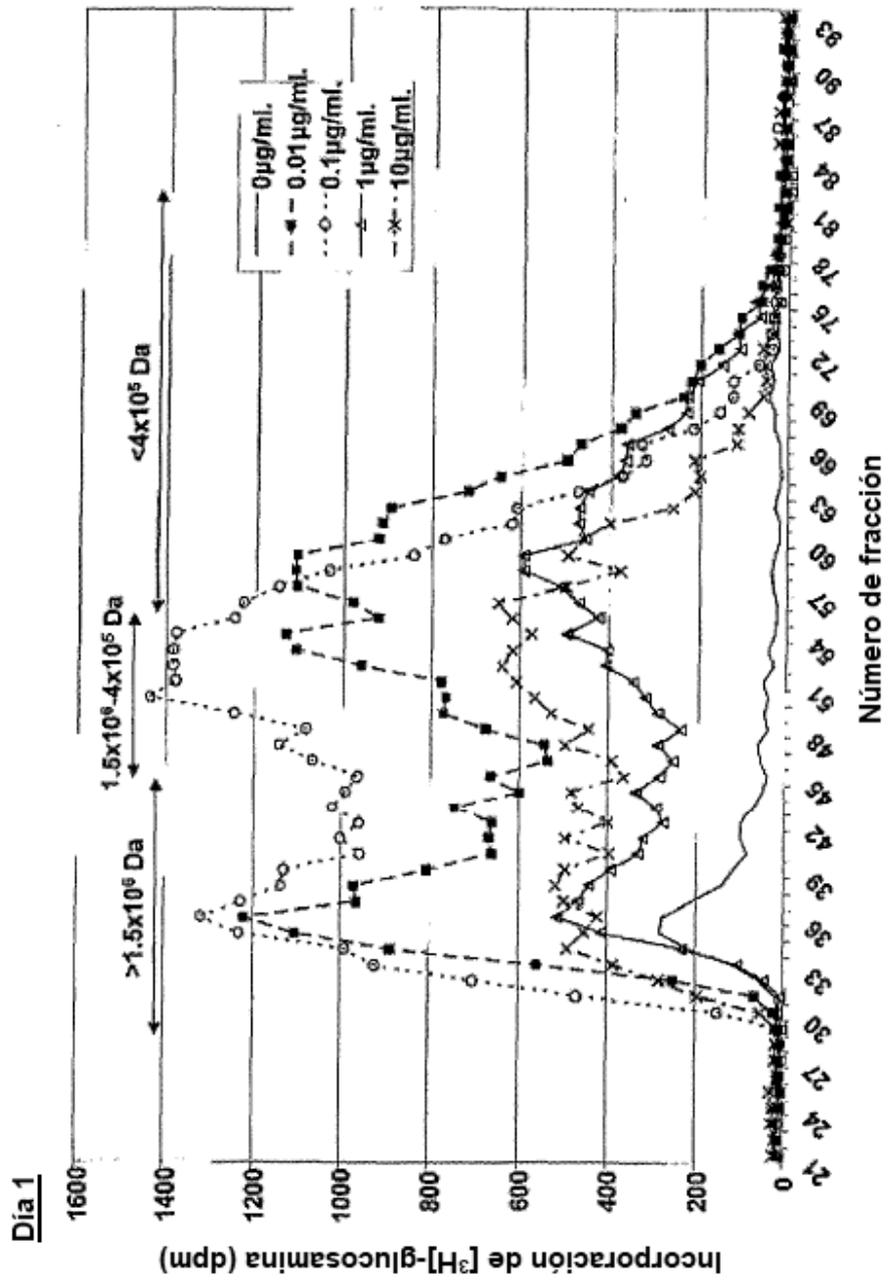


Figura 11

Evaluación del tamaño molecular de hialuronano novo en fibroblastos tratados con PEP005, + TGF- $\beta_1$   
 Día 3.

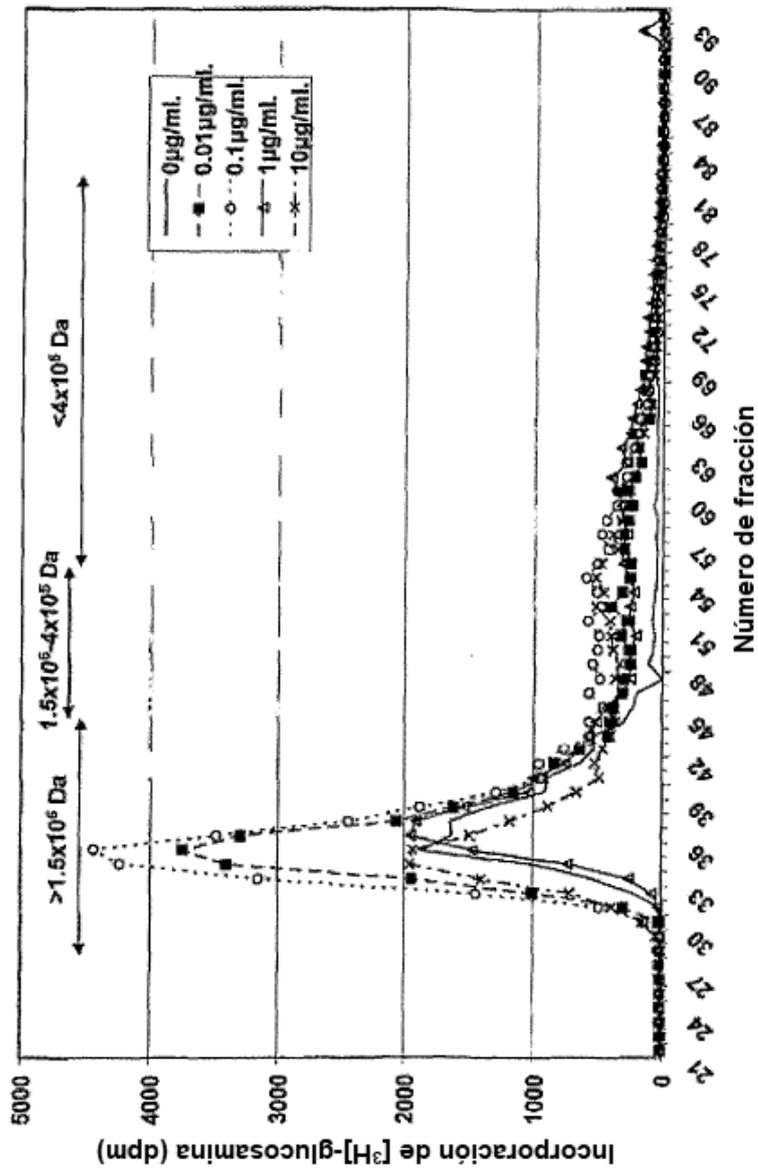


Figura 12