

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 565**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 31/65** (2006.01)

**A61K 31/196** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2006 PCT/US2006/003588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.08.2006 WO06083979**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2006 E 06734175 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 1853223**

54 Título: **Tratamiento local de neurofibromas**

30 Prioridad:

**02.02.2005 US 649854 P**  
**07.04.2005 US 669813 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.12.2017**

73 Titular/es:

**ONCOSYNERGY, INC. (100.0%)**  
**409 Illinois St., Room 3041**  
**San Francisco, CA 94158, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, RUIHONG;**  
**RUBENSTEIN, ALLAN E.;**  
**SHEN, XIAODONG;**  
**STEWART, SCOTT y**  
**YU, JIN-CHEN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones :**

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

**ES 2 646 565 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 local de neurofibromas

5 **Antecedentes de la invención**

10 La neurofibromatosis tipo 1 (NF1) es el trastorno de un solo gen más común que afecta al sistema nervioso humano. Se transmite genéticamente de forma autosómica dominante. La NF1 afecta aproximadamente a 1,5 millones de personas en todo el mundo y no existe una predilección racial, étnica o geográfica para el trastorno. La NF1 es causada por una mutación en el gen NF1, que produce neurofibromina, un supresor tumoral. Una alta tasa de mutación espontánea (50 %) en el locus NF1 asegura que sea poco probable que el trastorno disminuya significativamente en la población debido a detección genética.

15 Las personas afectadas por NF1 tienen un mayor riesgo de desarrollar una variedad de tumores del sistema nervioso, incluidos los neurofibromas dérmicos, subdérmicos y plexiformes; los astrocitomas de la vía óptica y los tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos ("MPNST") y de discapacidad del aprendizaje, escoliosis y ciertas formas de leucemia. Estos tumores pueden causar desfiguración, daño al sistema nervioso y dolor crónico. Los neurofibromas dérmicos son la lesión más común en NF1 y ocurren en el 90 % de los individuos afectados. Los neurofibromas dérmicos suelen ser pequeños (menos de 2 cm de diámetro), múltiples y de primer desarrollo durante la pubertad. Por lo general, tienen un alto contenido de colágeno, una actividad metabólica muy baja y, a diferencia de los neurofibromas plexiformes, nunca experimentan una degeneración maligna. Nunca se ha informado de un caso de degeneración maligna en un neurofibroma dérmico de forma espontánea o en pacientes que hayan recibido radioterapia regional para diversas malignidades o que hayan recibido quimioterapia por malignidad.

25 Ciertos pacientes pueden desarrollar algunos de los mismos signos desfigurantes que están asociados a la enfermedad del hombre elefante, un trastorno separado que originalmente se pensó que era NF1. El único tratamiento en la actualidad es la extirpación quirúrgica. Sin embargo, a menudo los tumores no pueden eliminarse sin causar problemas neurológicos y/o cosméticos importantes, y frecuentemente vuelven a crecer. No responden a la radioterapia ni a los agentes quimioterapéuticos conocidos.

30 Los neurofibromas cutáneos y subcutáneos se pueden desarrollar en cualquier momento de la vida, pero su número suele ser pequeño antes de la pubertad. El número total de neurofibromas observados en adultos varía de unos pocos a miles. Se desarrollan neurofibromas cutáneos y subcutáneos adicionales a lo largo de la vida, aunque la tasa de aparición puede variar mucho de un año a otro. Además de una cura real para la afección, un tratamiento no quirúrgico efectivo para los neurofibromas dérmicos es la prioridad más alta para las 100.000 personas afectadas en los EE.UU. por la NF1. Los neurofibromas dérmicos causan desfiguración, dolor y estrés psicológico y financiero significativos y deben considerarse una importante necesidad médica no satisfecha en esta población. El desarrollo de un tratamiento local para neurofibromas dérmicos no ha sido explorado previamente debido a varios factores, incluyendo el índice de proliferación relativamente bajo con respecto a otros tumores, y el hecho de que los tumores residan algo más profundos en la piel, especialmente en comparación con carcinomas de células basales y escamosas. Este tratamiento local abarca tanto el tratamiento tópico como el tratamiento intralesional o intradérmico en el sitio del neurofibroma. Por lo tanto, aunque **dicho** tratamiento **local** de estos neurofibromas dérmicos sería un tratamiento valioso para una necesidad médica insatisfecha, previamente no se ha realizado el trabajo en esta área. El documento WO2006/071966 A2 se refiere a compuestos de rapamicina en el tratamiento de la neurofibromatosis tipo 1.

45 Landy, Howard et al., Journal of Neurosurgery, octubre de 2005, vol. 103, n.º 4, págs. 760-763 informa sobre la remisión prolongada de un tumor recurrente de la vaina del nervio periférico maligno del nervio mediano después del tratamiento multimodal.

50 Tozon, N. y col., Anticancer Research, 2001, vol. 21, n.º 4A, págs. 2483-2488 se refiere a la potenciación de la eficacia antitumoral local del cisplatino en perros y gatos.

El documento GB 2 398 495 A se refiere a una preparación de administración de fármaco que comprende al menos un fármaco antitumoral y un vehículo tópico para el fármaco.

Cavaliere, A. et al., Tumori, vol. 76, n.º 2, 1990, pp. 179-181 describe efectos carcinogénicos de 5-fluorouracilo.

55 Kamm J., Journal of the American Academy of Dermatology, vol. 6, n.º 4, 1 de abril de 1982, pp. 652-659 se refiere a los efectos cancerígenos de los retinoides.

Davies R. E. et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, vol. 22 de 1981, p. 374 describe los efectos cancerígenos de los retinoides a través de la administración tópica.

Prejean J. D. y Montgomery J. A., Drug Metabolism Reviews, vol. 15, n.º 3, 1984, págs. 619-649, describen diferentes efectos cancerígenos de los diferentes grupos de agentes anticancerosos.

60

**Sumario de la invención**

Un aspecto de la invención es una composición para su uso en el tratamiento de un neurofibroma (por ejemplo, neurofibroma dérmico, neurofibroma subdérmico o neurofibroma plexiforme superficial) en un sujeto. La composición comprende (a) al menos un agente para disminuir el impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto, y opcionalmente (b) un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable que ayuda a transportar el agente a través de

65

la piel hacia el tumor, y preferentemente mantiene el agente sobre la piel del sujeto durante un periodo de tiempo como se define en la reivindicación 1 adjunta al presente documento. La composición para su uso de acuerdo con la presente invención comprende como alternativa (a) al menos un agente para disminuir el impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto, y opcionalmente, (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para inyección.

Otro aspecto más de la invención es el uso de al menos un agente para disminuir el impacto negativo sobre el neurofibroma en un sujeto con un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable que ayuda a transferir el agente a través de la piel hacia el tumor y preferentemente mantiene al agente en el piel del sujeto durante un periodo de tiempo para la fabricación de un medicamento para tratar tópicamente un neurofibroma (por ejemplo, un neurofibroma dérmico, un neurofibroma subdérmico o un neurofibroma plexiforme superficial) como se define en la reivindicación 8 adjunta al presente documento.

En un aspecto adicional de la invención, la administración local de la composición farmacéutica se inyecta intralesionalmente en un neurofibroma. Por consiguiente, la composición comprende al menos un agente para disminuir el impacto negativo del neurofibroma en un sujeto y un excipiente farmacéuticamente aceptable que ayuda a administrar intralesionalmente en el tumor de modo que el agente esté en contacto con el tumor del sujeto durante un periodo de tiempo.

Otros aspectos de la invención pueden ser evidentes para un experto en la técnica después de leer la siguiente descripción detallada.

#### Descripción detallada

Al llevar a cabo esta invención, se aplica una composición a la superficie de la piel en la región del tumor. La composición se puede aplicar en cualquiera de los métodos conocidos para aplicar una composición. Por lo tanto, la composición se puede pulverizar, aplicar con un paño, frotar o adherir sobre la piel usando un parche o similar. Además, se puede aplicar a la piel y transportarse a través de la piel mediante un mecanismo de microinyección, electroforesis, ultrasonidos o radiofrecuencia. Se puede administrar usando un sistema de administración que sea viral o neumático. El agente se puede formular como nanopartículas, dendrímeros o liposomas. La composición puede adoptar la forma de polvo, una solución o una suspensión líquida, una crema, una loción, una pomada, un gel, u otra composición que permita que la composición se mantenga en la piel durante un periodo de tiempo que es suficiente para hacer que el agente migre a través de la piel y hacia el tumor.

La composición se aplica a la piel en la región del tumor o se inyecta por vía intralesional en el tumor. En general, los tumores son evidentes y causarán desfiguraciones en la piel. Por lo tanto, la aplicación de la composición se realizará directamente sobre la superficie de la piel que está en la región del tumor. Esa región estará en cualquier parte de la piel que será transportada a través de la piel hacia el tumor para causar que el agente activo en la composición actúe sobre el tumor. Una vez que la composición se aplica a la piel, se mantiene en la piel durante un periodo de tiempo que es suficiente para transportar el agente a través de la piel hasta el tumor para disminuir el impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto.

Para inyección intralesional, hay una variedad de métodos de administración de fármacos "activos" y la administración pasiva de fármacos (una formulación con o sin un potenciador de la penetración). Todas las tecnologías perturban la capa de queratina de la epidermis para mejorar la administración de fármacos, con energía de algún tipo o mecánicamente. Los métodos incluyen: iontoforesis; ultrasonidos, radiofrecuencia (RF) y microagujas (dermoabrasión). También se puede utilizar la tecnología de inyección sin aguja, que es una microaguja unida a un cartucho de CO2 que fuerza al medicamento a través de la piel.

Disminuir el impacto negativo significa que (1) el tamaño del tumor puede estabilizarse y no aumentar, (2) el tamaño del tumor puede reducirse, o (3) el dolor y/o el picor asociados al tumor pueden verse reducidos. Preferentemente, el tamaño del tumor se reduce significativamente ya que la desfiguración causada por los neurofibromas es una gran desventaja de la afección. Los marcadores para determinar si una composición está actuando para disminuir el impacto negativo en un sujeto incluyen medir el tamaño del tumor durante un periodo de tratamiento y entrevistar al sujeto para determinar si hay una reducción en el nivel de dolor en el sujeto. Se pueden desarrollar otros marcadores tales como un índice de proliferación que muestra la tasa de crecimiento del tumor, un índice apoptótico que muestra la tasa de muerte de las células tumorales o la densidad de los vasos. También se pueden usar otros biomarcadores que pueden ser evidentes para un experto en la técnica para medir el éxito de la composición de esta invención. Por ejemplo, se pueden usar los biomarcadores que controlan el estado de activación de la ruta Ras-Raf-MEK-MAPK para medir la inhibición objetivo en tejidos tumorales mediante la composición de esta invención. En la mayoría de los casos, se establece una línea basal antes del tratamiento midiendo el tamaño del tumor usando un calibrador o usando una técnica de imagen MRI, o estableciendo un índice para el tumor no tratado. Una vez que se establece la línea basal, el tratamiento puede comenzar y las mediciones se pueden tomar periódicamente para determinar el éxito del tratamiento.

Los agentes que son útiles como agente único o como combinación de uno o más agentes en la composición para aplicarse a la superficie de la piel o inyectados intralesionalmente en el tumor son los que disminuyan el impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto. Los agentes que se usarán de acuerdo con la presente invención son agentes que no son carcinogénicos. Las Monografías de la FDA o IARC tienen listas de compuestos/agentes que se consideran carcinogénicos y no se aconseja ni se permite su uso en seres humanos. Aunque la bleomicina se menciona a continuación como agente, no es deseable como agente preferido porque es carcinogénico. Por ejemplo, si dichos agentes pueden ser un agente quimioterapéutico (por ejemplo, un agente antineoplásico, una citotoxina o un agente antiproliferativo); un agente esclerosante; un inmunomodulador (por ejemplo, un inmunorregulador, un inmunosupresor, o un inmunoestimulante) o un agente antiinflamatorio, tal como un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) o un inhibidor de la Cox-1 y 2; un agente que modula la transcripción génica, por ejemplo, un inhibidor de la HDAC (histona deacetilasa) (por ejemplo, ácido valpróico, FK228, trapoxina), un inhibidor de la angiogénesis; un agente que altera la estructura, función, localización o modificación postraduccional de GTPasas pequeñas (por ejemplo, inhibidores de la farnesil transferasa [R115777], inhibidores de la isoprenil cisteína transferasa (cysmethnil), un agente que actúa como agente quimiopreventivo como vitaminas, derivados de vitaminas, antioxidantes, suplementos nutricionales (por ejemplo fenretinida, extracto de té verde que contiene EGCG), un agente antifibrótico, un agente dirigido contra la señalización apoptótica o antiapoptótica, un inhibidor de quinasa (por ejemplo, un inhibidor de proteína quinasa o un inhibidor de lípido quinasa); un alquilfosfolípido; un inhibidor de proteínas chaperonas, tal como un inhibidor de la proteína de choque térmico (por ejemplo, HSP90); un agente antifúngico; un agente que restaura la función de un gen mutado, tal como un agente que suprime las mutaciones sin sentido (por ejemplo, gentamicina); un agente terapéutico basado en ácido nucleico, un inhibidor de fosfatasa, un inhibidor de proteasa o un agente que inhibe la hiperplasia de la piel (por ejemplo, queratosis actínica, melanoma, sarcoma de Kaposi, carcinomas de células basales o de células escamosas, o metástasis cutáneas de otros cánceres). Para el tratamiento tópico, la composición preferentemente contiene un agente de penetración en la piel que ayuda a empujar el agente a través de la piel hacia el tumor.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos que son útiles son (1) agentes que interfieren con la replicación del ADN por inhibición de la topoisomerasa, (2) agentes que interrumpen los microtúbulos y/o el huso mitótico, (3) agentes que actúan como agentes alquilantes o dañinos para el ADN, o (4) agentes que interfieren con la síntesis de nucleótidos, es decir, antimetabolitos. Los agentes quimioterapéuticos específicos incluyen 5-fluorouracilo (5-FU) y tiotepa. Cada uno de estos materiales es bien conocido por los expertos en la materia y se puede obtener a partir de fuentes convencionales.

Los inhibidores de proteína quinasa son compuestos que se dirigen a quinasas hiperactivadas en neurofibromas, como componentes de la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno Ras (por ejemplo MEK y Raf quinasas), tirosina quinasas receptoras y no receptoras, y la vía AKT-mTOR, que promueven la proliferación y la supervivencia celulares, respectivamente. Los inhibidores de las lípido quinasas son compuestos que se dirigen a la ruta de la fosfatidilinositol 3-quinasa, que está hiperactivada en los neurofibromas y da lugar a una mayor supervivencia celular.

Los inhibidores de la proteína chaperona son los que inhiben la proteína de choque térmico o la función peptidil-prolil isomerasa. La actividad de la proteína de choque térmico es necesaria para mantener los niveles de proteínas fisiológicas de Raf y KSR, dos componentes de la vía de la proteína quinasa activada por Ras-Mitógeno, además de muchas otras moléculas de señalización.

Los inhibidores de la angiogénesis son aquellos que bloquean (1) la cascada de señalización de la angiogénesis, tal como la señalización del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), (2) la ruptura de la matriz extracelular, tal como la inducida por las metaloproteinasas de la matriz (por ejemplo, halofuginona), (3) el crecimiento, la supervivencia y la migración de células endoteliales, o (4) un mecanismo de acción desconocido. Algunos de estos compuestos también pertenecen a otras categorías. Estos procesos angiogénicos, entre otros, son necesarios para garantizar el suministro adecuado de sangre a un tumor en crecimiento y son modos atractivos de intervención terapéutica para la NF1.

Es probable que la comunicación célula-célula, tanto química como física, entre numerosos tipos de células, incluidas las células de Schwann, los mastocitos y los fibroblastos, sea esencial para la progresión de la enfermedad del neurofibroma. Los inmunomoduladores, como los inhibidores de la calcineurina que bloquean la transcripción de las citoquinas y los factores de crecimiento, son un medio eficaz para interferir con la señalización entre células.

También son útiles los agentes que corrigen una mutación específica, como el reemplazo génico o la gentamicina para la reparación de mutaciones sin sentido. De acuerdo con la presente invención, el agente no carcinogénico se selecciona del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y un antibiótico de tetraciclina.

La presente descripción describe lo siguiente:

1. Un método para tratar un neurofibroma dérmico, un neurofibroma subdérmico, o un neurofibroma plexiforme superficial en un sujeto que necesita dicho tratamiento, cuyo método comprende administrar localmente una composición a la región del tumor, en la que la composición comprende (a) al menos un agente para disminuir el

impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto, y opcionalmente (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable que ayuda a transportar el agente al tumor donde preferentemente se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para afectar negativamente al neurofibroma. 2. El método de 1, en el que dicha administración local es la aplicación tópicamente de dicha composición a la superficie de la piel en la región del tumor, y en el que dicho excipiente ayuda a transportar el agente a través de la piel y hacia el tumor y preferentemente mantiene el agente sobre la piel del sujeto. 3. El método de 1, en el que dicha administración local es la inyección intralesionalmente de dicha composición en el tumor. 4. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente comprende un agente quimioterapéutico, en el que (1) el agente interfiere con la replicación del ADN mediante la inhibición de la topoisomerasa; (2) el agente interrumpe los microtúbulos y/o el huso mitótico; (3) el agente actúa como agente alquilante o dañino para el ADN; (4) el agente interfiere con la síntesis de nucleótidos o una combinación de los mismos. 5. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente comprende un agente esclerosante. 6. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente es un inmunomodulador, un inmunorregulador, un inmunosupresor, un inmunoestimulante, o un agente antiinflamatorio no esteroideo. 7. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente modula la transcripción génica. 8. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente es un inhibidor de la angiogénesis. 9. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente altera la estructura, función, localización o modificación postraduccional de GTPasas pequeñas. 10. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente es un agente quimiopreventivo. 11. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente es un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de proteína quinasas, un inhibidor de lípido quinasas, un inhibidor de proteínas de choque térmico, un inhibidor de proteínas chaperona, un inhibidor de fosfatasas o un inhibidor de proteasas. 12. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente es un agente antifibrótico. 13. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente es un alquilfosfolípido. 14. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente se dirige contra la señalización apoptótica o antiapoptótica. 15. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente es un agente terapéutico basado en ácido nucleico. 16. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente restaura la función de un gen mutado. 17. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente inhibe la hiperplasia de la piel. 18. El método de una cualquiera de 1-3, en el que el agente es un agente alquilante, tal como tiotepa o carboplatino; un antimetabolito o un análogo de nucleósidos, tal como 5-fluorouracilo, tricitabina, sangivamicina o tubercidina; un inhibidor de la topoisomerasa, tal como la podofilotoxina; un inhibidor de microtúbulos, como el mebendazol, un agente esclerosante, como la bleomicina, la doxiciclina o análogos de los mismos; un agente antiinflamatorio o un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE), como diclofenaco; un agente que modula la transcripción génica, tal como un inhibidor de la HDAC que comprende tricostatina A o ácido valpróico; un agente quimiopreventivo, tal como un retinoide, tal como fenretinida; un alquilfosfolípido, tal como miltefosina; un inhibidor de HSP90, tal como derivados de geldanamicina, tales como 17-AAG, radicicol o análogos de los mismos; halofuginona, gentamicina, rapamicina o una combinación de los mismos. 19. El método de 1-18, en el que el excipiente incluye un agente de penetración en la piel.

También se describen composiciones para su uso en el tratamiento de neurofibromas. Por lo tanto, la presente invención proporciona: 1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un neurofibroma dérmico, un neurofibroma subdérmico o un neurofibroma plexiforme superficial en un sujeto, composición que comprende (a) al menos un agente para disminuir el impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto, y opcionalmente (b) un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable que ayuda a transportar el agente a través de la piel hacia el tumor y preferentemente mantiene el agente sobre la piel del sujeto durante un periodo de tiempo como se define en las reivindicaciones 1 a 7 adjuntas al presente documento. 2. Un método para preparar un medicamento que comprende la composición como se ha descrito anteriormente para tratar tópicamente un neurofibroma dérmico, un neurofibroma subdérmico o un neurofibroma plexiforme superficial, cuyo método comprende combinar al menos un agente para disminuir el impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto con un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable que ayuda a transportar el agente o agentes a través de la piel hacia el tumor y preferentemente mantiene el agente o agentes sobre la piel del sujeto durante un periodo de tiempo.

La presente invención proporciona particularmente:

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un neurofibroma dérmico, un neurofibroma subdérmico o un neurofibroma plexiforme superficial en un sujeto para su administración local, composición que comprende (a) al menos un agente para disminuir el impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto, en el que el agente es no carcinogénico, y opcionalmente (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable que ayuda a transportar el agente al tumor y donde se mantiene preferentemente durante un periodo de tiempo suficiente para impactar negativamente al neurofibroma, en el que los agentes no carcinogénicos se selecciona del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y un antibiótico de tetraciclina.
2. La composición para su uso de acuerdo con 1, en la que dicha administración local es la inyección intralesionalmente de dicha composición en el tumor.
3. La composición para su uso de acuerdo con 1, en la que dicha administración local es la aplicación tópicamente de dicha composición a la superficie de la piel en la región del tumor, y en el que dicho excipiente ayuda a transportar el agente a través de la piel y hacia el tumor y preferentemente mantiene el agente sobre la piel del sujeto.
4. La composición para su uso de acuerdo con 1, en la que el antibiótico de tetraciclina es doxiciclina.
5. La composición para su uso de acuerdo con 1, en la que el agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) es diclofenaco.

6. La composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de 1, 3 a 5, en la que el excipiente farmacéuticamente aceptable incluye un agente de penetración en la piel.

7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de 1 a 6 para su administración tópica.

5 8. Uso de al menos un agente, en el que el agente es no carcinogénico, para disminuir el impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto con un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable que ayuda a transportar el agente o agentes a través de la piel hacia el tumor y preferentemente mantiene el agente o agentes sobre la piel del sujeto durante un periodo de tiempo, en el que el agente no carcinogénico se selecciona del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y un antibiótico de tetraciclina para la fabricación de un medicamento para tratar tópicamente un neurofibroma dérmico, un neurofibroma subdérmico o un neurofibroma plexiforme superficial.

9. Uso de acuerdo con 8, en el que el antibiótico de tetraciclina es doxiciclina.

10. Uso de acuerdo con 8, en el que el agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) es diclofenaco.

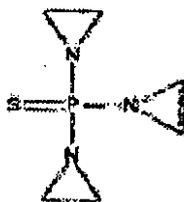
11. Uso de acuerdo con uno cualquiera de 8 a 10, en el que el excipiente farmacéuticamente aceptable incluye un agente de penetración en la piel.

15 Los ejemplos de compuestos solos o en combinación que son útiles en esta invención como agente para disminuir el impacto negativo de un neurofibroma sobre un sujeto incluyen tiotepa, doxiciclina, bleomicina, diclofenaco, carboplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), mebendazol, semiuginona, gentamicina, rapamicina, miltefosina y similares.

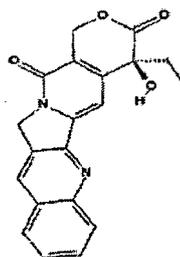
20 Además, el agente o agentes para disminuir el impacto negativo del neurofibroma en un sujeto, incluyen pero no se limitan a los siguientes agentes:

1. Agentes quimioterapéuticos, tales como citotoxinas, agentes antineoplásicos o antiproliferativos, por ejemplo: agentes tales como:

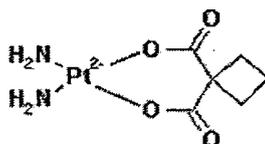
25 Un agente alquilante, como tiotepa,



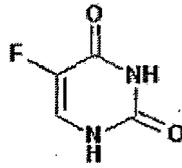
30 Un inhibidor de la topoisomerasa, como la camptotecina,



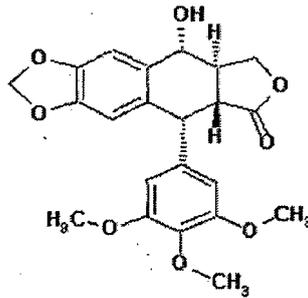
35 Carboplatino,



Un antimetabolito, como 5-fluorouracilo (5-FU)

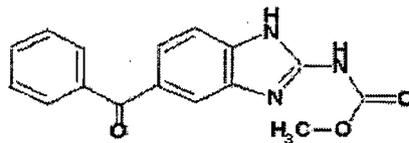


Un inhibidor de topoisomerasa, como podofilotoxina,



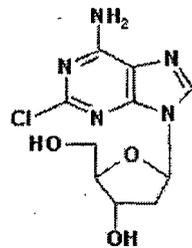
5

Un inhibidor de microtúbulos, como mebendazol,



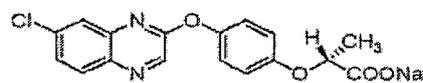
10

Un antimetabolito o un análogo de nucleósido, como cladribina



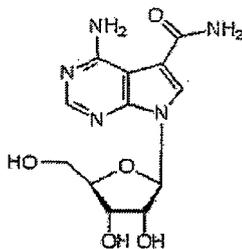
15

Un inhibidor de topoisomerasa, tal como XK469 (ácido 2-(4-((7-cloro-2-quinoxalinil)oxi)-fenoxi) propiónico),

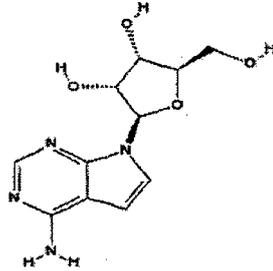


20

Un análogo de nucleósido, como sangivamicina

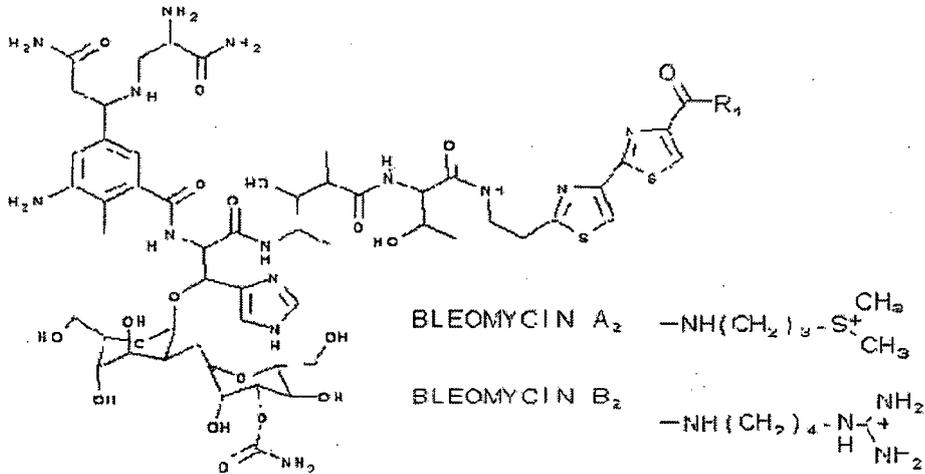


Un análogo de nucleósido, como tubercidina,



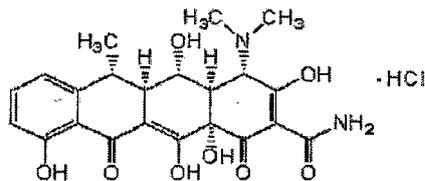
5 2. Agentes esclerosantes, por ejemplo:

Bleomicina, un antibiótico antineoplásico,



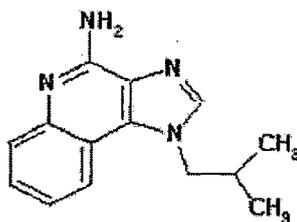
10

Un análogo o antibiótico de tetraciclina, como doxiciclina



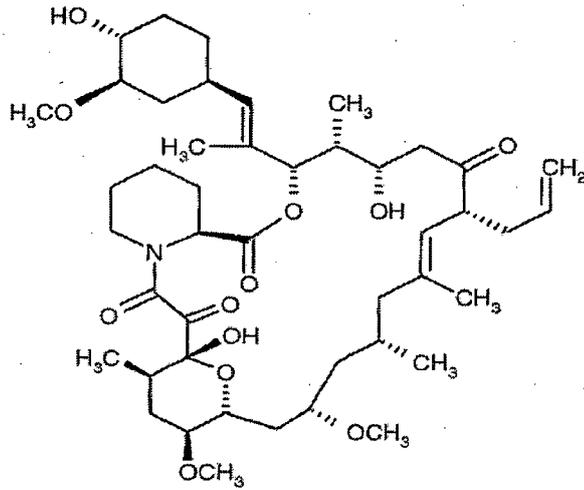
15 3. Inmunomoduladores o inmunorreguladores o inmunoestimulantes o inmunosupresores, por ejemplo:

Inmunoestimulantes, como Imiquimod (modificador de la respuesta inmune o ligando o agonista de TLR7/8),



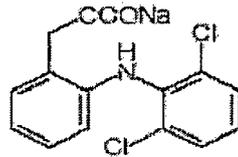
20

Inmunosupresores, como Tacrolimus (FK506)



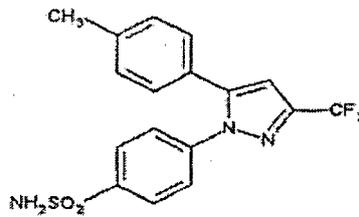
4. Un agente antiinflamatorio o antiinflamatorio no esteroideo (AINE), como:

5 Diclofenaco



10 Celecoxib (también un inhibidor de la Cox-1 y 2 o un agente antiinflamatorio),

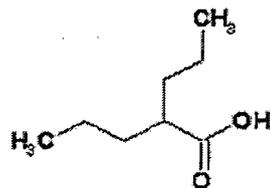
10



15 5. Agentes que modulan la transcripción génica; por ejemplo, inhibidores de la HDAC (histona deactilasa), por ejemplo:

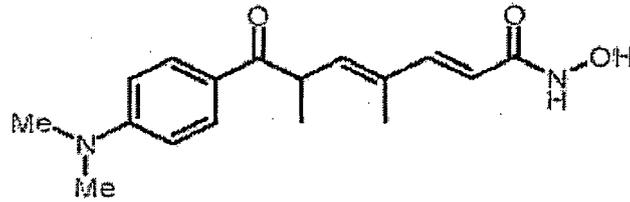
15

Una clase de ácido graso de inhibidores de la HDAC, como el ácido valpróico,

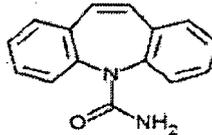


20 Una clase de ácido hidroxámico de inhibidores de la HDAC, como Tricostatina A (TSA)

20

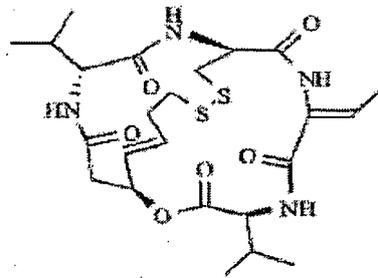


Carbamazepina (abajo) y sus derivados tales como epóxido de carbamazepina,



5

Una clase de tetrapéptido cíclico de inhibidores de la HDAC, como el depsipéptido FK228 (FR901228),

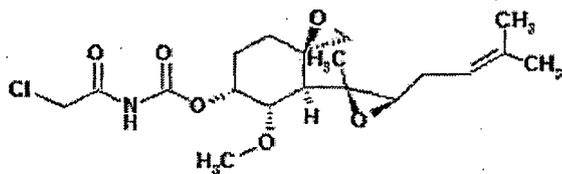


10

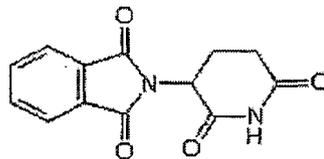
6. Inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo:

Una fumagilina, que es secretada por el hongo *Aspergillus fumigatus*, y sus análogos tales como TNP-470 [O-(cloroacetilcarbamoil) fumagilol] que se muestran a continuación:

15



Talidomida, también un agente inmunomodulador

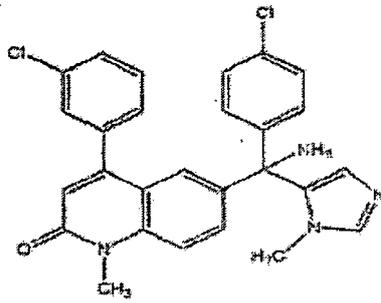


20

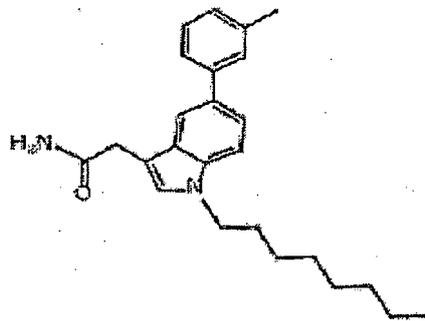
7. Agentes que inhiben el proceso celular necesario para la modificación de GTPasas pequeñas como:

Inhibidores de la farnesil transferasa [por ejemplo, R115777, (B)-6-[amino (4-clorofenil) (1-metil-1H-imidazol-5-il) metil]-4-(3-clorofenil)-1-metil-2 (1H)-quinolinona],

25

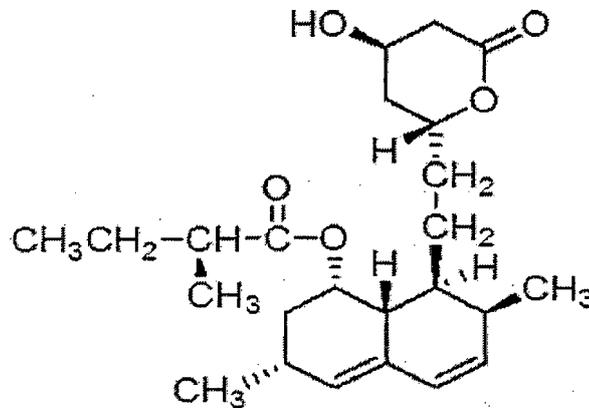


Inhibidores de isoprenil cisteína transferasa [por ejemplo, cysmethnil]



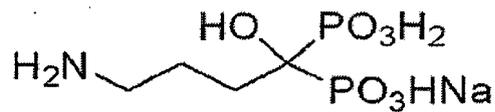
5

Inhibidores de la HMG-CoA (estatinas, por ejemplo, lovastatina)



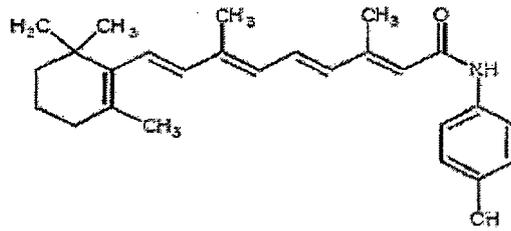
10

Bisfosfonatos (por ejemplo, alendronato, como inhibidores de la vía del mevalonato)

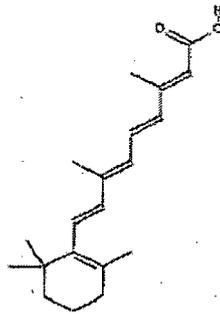


15 8. Agentes quimiopreventivos, por ejemplo:

Retinoides sintéticos (fenretinida)

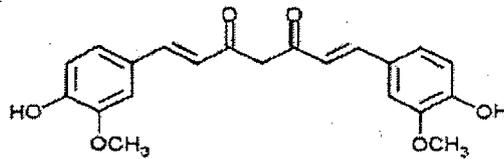


Ácido retinoico [ácido 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil)-nona-2,4,6,8-tetraenoico] y análogos,



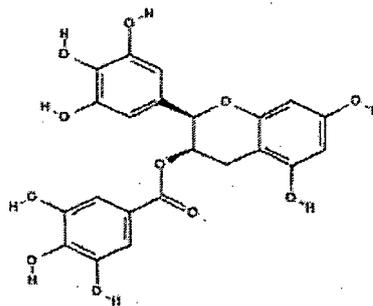
5

Curcumina y derivados,

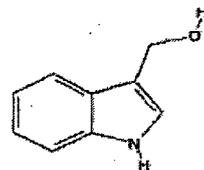


10

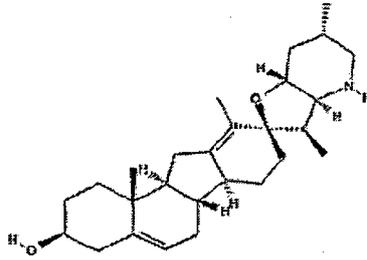
EGCG, (-)-galato de epigallocatequina (ver a continuación) y análogos



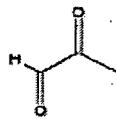
15 I3C (Indol-3-carbinol),



20 Ciclopamina,



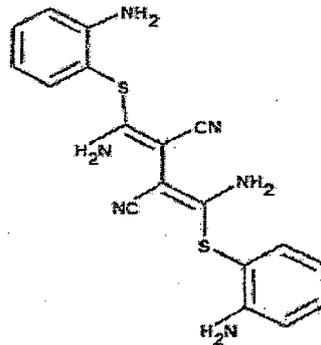
Metilglioxal,



5

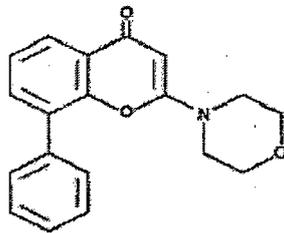
9. Inhibidores de quinasas, inhibidores de MEK, inhibidores de Raf, inhibidores de mTOR, inhibidores de PI3K, tales como por ejemplo:

10 Inhibidores de MEK, tales como U0126 [1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis (2-aminofeniltio)-butadieno],

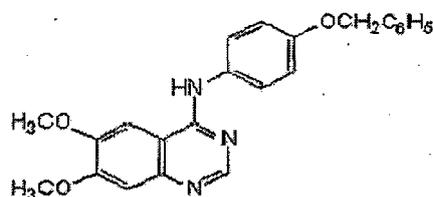


Inhibidores de P13K, tales como Ly294002 [2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona]

15

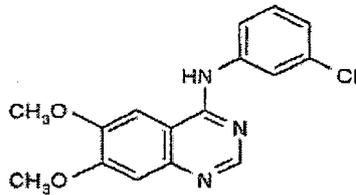


Inhibidores de EGFR/ErbB2, tales como 4-(4-benciloxianilino)-6,7-dimetoxiquinazolina,

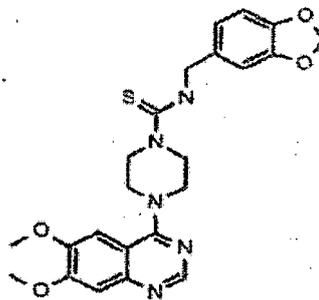


20

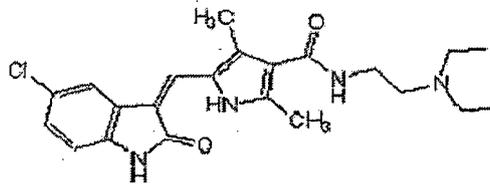
AG1478 (inhibidor de EGFR), 4-(3-cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina



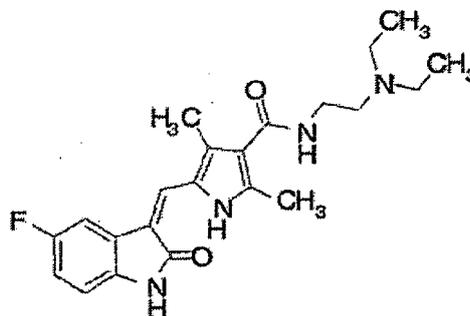
- 5 Inhibidores de múltiples tirosina quinasas, por ejemplo, inhibidores de PDGFR como KN2941 (4-(6,7-dimetoxi-4-quinazolinil)-N-(3,4-metilendioxibencil)-1-piperaziniocarboxamida)



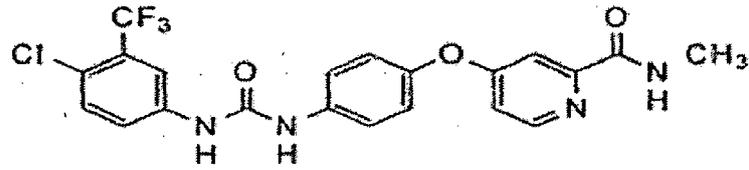
- 10 Inhibidores de múltiples quinasas tales como SU11652, 5-[(Z)-(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno) metil]-N-[2-(dietilamino) etil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida



- 15 Inhibidores de múltiples quinasas tales como SU11248 (el nombre comercial es Sutent), 5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno) metil]-N-[2-(dietilamino) etil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida

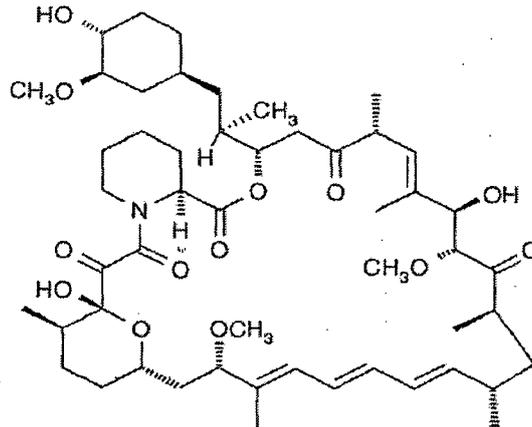


- 20 Inhibidores de múltiples quinasas, por ejemplo, VEGFR2 y Raf quinasas tales como Bay43-9006 (NEXAVAR o Sorafenib), 4-(4-{3-[4-cloro-3-(trifluorometil) fenil] ureido} fenoxi)-N2-metilpiridin-2-carboxamida

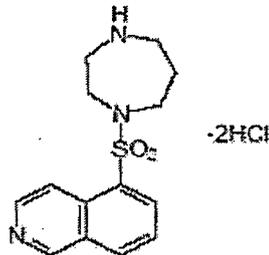


Inhibidores de mTOR, tales como rapamicina (también un inmunosupresor, ver a continuación) y profármacos o análogos,

5



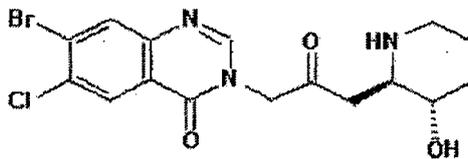
Inhibidores de Rho quinasa como Fasudil, [1-(5-isoquinolinsulfonil) homopiperazina]



10

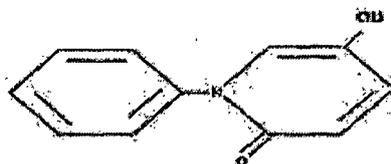
10. Nuevos antifibróticos, que pueden incluir agentes que también son inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo:

15 Bromhidrato de halofuginona [bromhidrato de (+/-)-trans-7-bromo-6-cloro-343-(3-hidroxi-2-piperidinil)-2-oxopropil]-4 (3H)-quinazolinona]



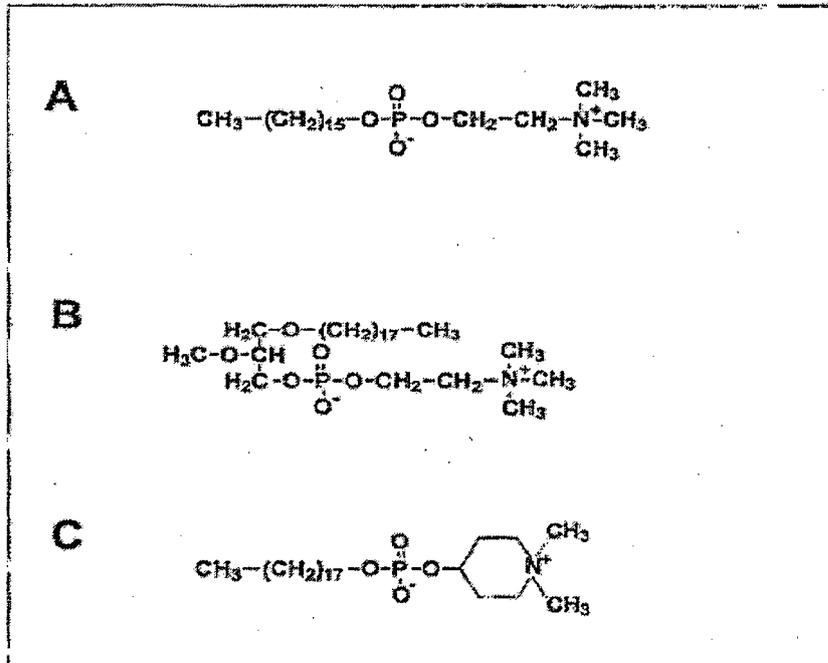
20

Pirfenidona (5-metil-N-fenil-2-1H-piridona-d5)



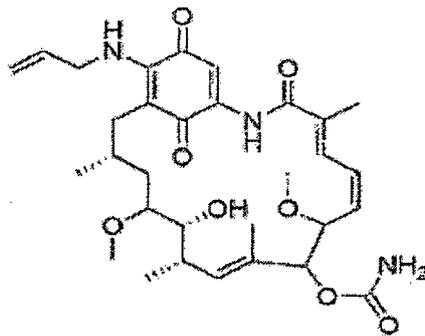
11. Alquilfosfolípidos, por ejemplo:

- 5 A. Miltefosina (HePC)  
 B. Edelfosina (Et-18-OCH3)  
 C. Perifosina (D21266)



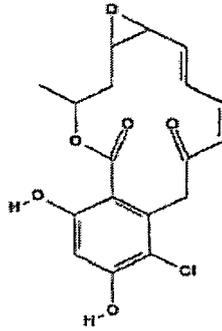
10 12. Inhibidores de HSP90 (inhibidores de la proteína de choque térmico)

Análogos/derivados de geldanamicina tales como 17-AAG y sus derivados, 17-AAG, 17-(alilamino)-17-demetoxigeldanamicina,

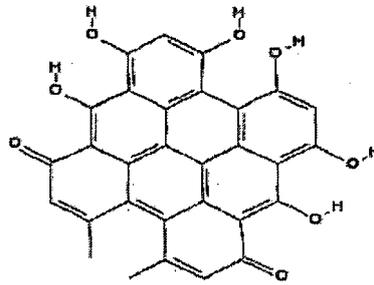


15

Radical y análogos,



Hipericina

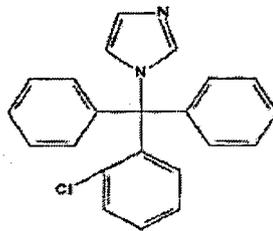


5

13. Agentes antifúngicos:

Clotrimazol y análogos,

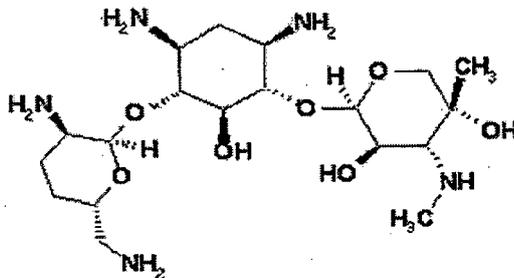
10



14. Agentes que restauran la función de un gen mutado, por ejemplo, agentes que suprimen las mutaciones sin sentido, por ejemplo:

15

Gentamicina



20 Al preparar las composiciones de esta invención, uno se guía por las enseñanzas de (1) Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 17ª, 18ª o 19ª edición, ISBN: O-912734-04.3, (también llamada "Remington: The Science and Practice of Pharmacy"); (2) Pharmaceutics - The Science of Dosage Form Design, Aulton, Churchill

Livingston; (3) Appleton and Lange Review of Pharmacy (7ª u 8ª Ed) de Hall and Reiss, Appleton and Lange; y similares, todos los cuales se incorporan en el presente documento como referencia. Para la administración de nanopartículas o liposomas, hay más información disponible en <http://www.happ1.com/special/mar013.htm> y <http://www.collabo.com/liposome.htm>. La información relacionada con la tecnología de los dendrímeros se encuentra en <http://www.ringer.com/dendrimer/one.htm>.

## Ejemplos

Los agentes útiles para tratar neurofibromas en la presente invención se pueden seleccionar mediante varios métodos descritos en este documento. Por ejemplo, varios compuestos/agentes descritos en la presente memoria así como otros agentes que se pueden seleccionar se analizan en un ensayo basado en células por su potencia para inhibir la proliferación celular de un panel de líneas celulares relacionadas con la NF1, se analizan para determinar un efecto en ensayos de explantes de neurofibroma dérmico, y se analizan para determinar un efecto en los modelos de xenoinjertos para neurofibromas dérmicos.

### I. Ensayos *in vitro*

#### 1) Ensayos de proliferación celular

Se emplearon varias células o líneas celulares fisiológicamente relevantes para medir la potencia del compuesto en ensayos de proliferación celular. Estas células incluyen: (1) células tumorales de la vaina del nervio periférico maligno humano deficiente para NF1 (MPNST), (2) células de Schwann embrionarias de ratón *Nf1*<sup>-/-</sup> y (3) células de ratón deficientes para *Nf1*- y *p53*. Se cultivan de células de Schwann de ratón en placas recubiertas con laminina y se crecen en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/medio F12 de Ham (F12), una mezcla 1:1 de medio DMEM y F12, complementado con heregulina-β1 recombinante (10 ng/ml), forskolina (2 μM) y suplemento de N2 (Invitrogen, California, n.º Cal 17502-048). Todas las otras células se cultivan en DMEM con el 10 % de suero bovino fetal (SFB). Las siguientes publicaciones describen la preparación de las líneas celulares utilizadas en el ensayo de proliferación celular.

Basu, T. N., Gutmann, D. H., Fletcher, J. A., Glover, T. W., Collins, F. S., and Downward, J. (1992) *Nature* 356, 713-715

DeClue, J. E., Papageorge, A. G., Fletcher, J. A., Diehl, S. R., Ratner, N., Vass, W. C., and Lowy, D. R. (1992) *Cell* 69, 265-273

DeClue, J. E., Heffelfinger, S., Benvenuto, G., Ling, B., Li, S., Rui, W., Vass, W. C., Viskochil, D., and Ratner, N. (2000) *J Clin Invest* 105, 1233-1241

Vogel, K. S., Klesse, L. J., Velasco-Miguel, S., Meyers, K., Rushing, E. J., and Parada, L. F. (1999) *Science* 286, 2176-2179

Manent, J., Oguievetskaia, K., Bayer, J., Ratner, N., and Giovannini, M. (2003) *J Neurosci Methods* 123, 167-173

Morrissey, T. K., Kleitman, N., and Bunge, R. P. (1991) *J Neurosci* 11, 2433-2442

Verdu, E., Rodriguez, F. J., Gudino-Cabrera, G., Nieto-Sampedro, M., and Navarro, X. (2000) *J Neurosci Methods* 99, 111-117

Kim, H. A., Ling, B., and Ratner, N. (1997) *Mol Cell Biol* 17, 862-872

Zhu, Y., Ghosh, P., Charnay, P., Burns, D. K., and Parada, L. F. (2002) *Science* 296, 920-922

Zhu, Y., Romero, M. I., Ghosh, P., Ye, Z., Charnay, P., Rushing, E. J., Marth, J. D., and Parada, L. F. (2001) *Genes Dev*, 15, 859-876

Muir, D., Neubauer, D., Lim, I. T., Yachnis, A. T., and Wallace, M. R. (2001) *Am J Pathol* 158, 501-513

Li, Y., Rao, P. K., Wen, R., Song, Y., Muir, D., Wallace, P., van Home, S. J., Tennekoon, G. I., and Kadesch, T. (2004) *Oncogene* 23, 1146-1152

Para realizar ensayos de proliferación celular, se sembró el número apropiado de células puede alcanzar el ~70 % de confluencia en 3 días (por ejemplo, 3000-6000 células/pocillo para células MPNST humanas y células de ratón deficientes para *Nf1/p53*, 8000-10.000 células/pocillo para células de Schwann embrionarias de ratón) en placas de 96 pocillos. Se añadieron diversas concentraciones de cada compuesto/agente a analizar al medio de crecimiento y las células se cultivaron luego durante 3 días. Una vez completada la incubación, los medios se extrajeron con cuidado y se añadieron 100 μl de solución de ATPlite (Perkin Elmer, Boston, n.º Cat. 6016941) en cada pocillo. Las células viables se midieron detectando la luminiscencia generada por la reacción de la solución de ATPlite y el ATP en las células. Se determinaron los intervalos de potencia de diversos compuestos/agentes para inhibir la proliferación celular de varias líneas celulares relacionadas con NF1. Los criterios de selección para agentes/compuestos que son útiles como buenos candidatos para el tratamiento local de neurofibromas se basan en la selección de cualquier compuesto con una CI50 igual o inferior a 10 μM (la CI50 se define como la concentración de un inhibidor que se requiere para la inhibición de la proliferación celular en un 50 %). Los compuestos que cumplen dichos criterios son: agentes alquilantes (por ejemplo, tiotepa), antimetabolitos o análogos de nucleósidos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, sangivamicina, tuberculina, triciribina, cladribina), inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, camptotecina, podofilotoxina, XK469), inhibidores de los microtúbulos (por ejemplo, mebendazol), agentes esclerosantes (por ejemplo, bleomicina, doxiciclina y análogos), agentes que modulan la transcripción génica (inhibidores de la HDAC, como tricostatina A), agentes quimiopreventivos (por ejemplo, retinoides como la

fenretinida, el ácido retinoico y análogos, curcumina y derivados, EGCG y análogos, y metilglioxal), inhibidores de quinasas (por ejemplo, U0126, LY294002, inhibidores de EGFR/ErbB2, KN2941, SU11652, Bay43-9006, rapamicina y sus análogos), alquilfosfolípidos (por ejemplo, miltefosina), inhibidores de HSP90 (por ejemplo, derivados de geldanamicina tales como 17-AAG, radicicol y análogos, hipericina), agentes antifúngicos (por ejemplo, clotrimazol), agentes que suprimen las mutaciones sin sentido (por ejemplo, gentamicina). Además, si se cree que los compuestos tienen mecanismos de acción que no de células autónomas (por ejemplo, inmunomodulador o antiangiogénesis) o desconocido, pueden no puntuar como positivos pero se analizarán en modelos de explantes, modelos de xenoinjerto, y en ensayos clínicos de prueba de principio con pacientes con NF1, si es posible.

## 2) Ensayo de explante

La eficacia del compuesto/agente se analizó en un modelo de explante tumoral *ex vivo* de la siguiente manera. El neurofibroma dérmico humano fresco se cortó en ocho fragmentos pequeños y se cultivó en placas de cultivo celular convencionales con medio que contenía DMEM/F12, el 10 % de SFB, heregulina y forskolina. Los fragmentos se dividieron en grupos de tratamiento y control. Se añadió compuesto a diferentes dosis al medio el día 1. No se añadió ningún compuesto en el grupo de control negativo. Todos los fragmentos de tumor se recogieron el día 3 y se procesaron para su histología mediante fijación con formalina e inclusión en parafina. Las secciones tisulares se cortaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina para el análisis histológico. El análisis histológico de las muestras de explantes pareadas se realizó a ciegas. Se usaron tres parámetros histológicos para puntuar las muestras de "-" a "+++": 1) integridad global del tejido; evaluamos la integridad del tejido al comparar la celularidad de las muestras tratadas con las muestras de control negativo. El área de baja celularidad se definió como > 30 % menos núcleo que el área similar en la muestra de control. La fotografía de cada muestra a 40X bajo un microscopio de campo brillante se tomó usando la cámara digital MagnaFire (Optronics, EE.UU.) y se almacenó en un ordenador. Las áreas de baja celularidad en las imágenes se midieron usando Photoshop y se calcularon como Longitud x Anchura, y luego se expresaron como porcentaje sobre el área total de la muestra. La integridad total del tejido se puntuó utilizando una puntuación de 0 a 2+. En resumen, la buena integridad del tejido se puntúa 0 (< 5 %), 1+ indica integridad media del tejido (5-25 %), 2+ integridad baja del tejido (> 25 %). Solo los casos 2+ se consideraron positivos "+" para la puntuación total final. 2) muerte celular: los portaobjetos se evaluaron mediante microscopía de campo brillante. Se contaron al menos 100 células por vista. La muerte celular se puntuó semicuantitativamente usando la puntuación de 0 a 3+. La ausencia de núcleo condensado o fragmentado se puntúa 0, 1+ indica el nivel más bajo de muerte celular detectable (< 10 %), 2+ muerte celular moderada (10-20 %) y 3+ muerte celular alta (> 30 %). Todos los casos de 2+ y 3+ se consideraron positivos "+" para la puntuación total final; y 3) el efecto sobre la vasculatura: los portaobjetos se evaluaron mediante microscopía de campo brillante. El efecto sobre la vasculatura en las muestras tratadas se determinó comparando con las vasculaturas en muestras negativas de control. Se contaron al menos 20 vasculaturas por muestra. El efecto sobre las vasculaturas se puntuó semicuantitativamente usando la puntuación de 0 a 3+. En resumen, la ausencia o el nivel más bajo de vasculatura dañada se puntúa 0 (< 5 %), 1+ indica algo de vasculatura dañada (5-25 %), 2+ alto (> 25 %). Todos los casos 1+ y 2+ se consideraron positivos "+" para la puntuación total final. La puntuación histológica final fue la suma de las puntuaciones de los tres parámetros anteriores, expresada como "-" a "+++". Cualquier compuesto con una puntuación histológica de "+" o más será un buen candidato potencial para el tratamiento local de los neurofibromas. Los compuestos que cumplen dichos criterios son: agentes alquilantes (por ejemplo, tiotepa, carboplatino), antimetabolitos o análogos de nucleósidos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, sangivimicina, tubercidina), inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, podofilotoxina), inhibidores de los microtúbulos (por ejemplo, mebendazol), agentes esclerosantes (por ejemplo, bleomicina), agentes antiinflamatorios o agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, diclofenaco), agentes que modulan la transcripción génica (inhibidores de la HDAC, tales como tricostatina A, ácido valpróico), agentes quimiopreventivos (por ejemplo, retinoides tales como la fenretinida), inhibidores de HSP90 (por ejemplo, derivados de geldanamicina tales como 17-AAG, radicicol y análogos).

## 3) Ensayo de xenoinjerto

La eficacia del compuesto se analizó en un estudio de reducción de la carga tumoral en un modelo de xenoinjerto de neurofibromatos dérmicos de ratón (DNF) de la siguiente manera. Se obtuvieron ratones hembra SCID de entre 5 y 6 semanas de edad y que pesaban aproximadamente 20 g en Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Los animales fueron implantados por vía subcutánea con fragmentos de DNF humanos frescos. 3 días después de la inoculación, los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento y control. Cada grupo contenía 6 ratones tumorados. Cada ratón fue marcado en la oreja y seguido individualmente durante todo el experimento. La dosificación comenzó el día 1 después de la aleatorización. El compuesto se administró intralesionalmente en un programa dos veces por semana durante 4 semanas. El compuesto más vehículo se administró a diferentes dosis en un volumen de 50  $\mu$ l. Se administró vehículo solo para servir como control negativo. Los ratones se pesaron dos veces por semana, y las mediciones del tumor se obtuvieron usando calibres dos veces a la semana, comenzando el día 1. Los volúmenes del tumor se calcularon mediante la fórmula convencional  $(W^2 \times L)/2$ , en la que L es la longitud y W es el ancho. (Blaskovich MA, Lin Q, Delarue FL, Sun J, Park HS, Coppola D, Hamilton AD, Sefti SM (2000), Diseño de GFB-111, una molécula de unión al factor de crecimiento derivada de plaquetas con actividad antiangiogénica y anticancerosa contra tumores humanos en ratones. *Nat Biotechnol* 18: 1065-1070). Los fragmentos tumorales se pesaron antes de la inoculación y después del sacrificio. Las diferencias se expresaron como porcentaje del peso del tumor original. Los tumores recolectados se procesaron para histología mediante

fijación con formalina e inclusión en parafina. Las secciones tisulares se cortaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina para su análisis histológico. El efecto del compuesto sobre xenoinjertos se determinó mediante: 1) mediciones del peso tumoral: las diferencias del peso del tumor antes y después del tratamiento en los grupos tratados y control se analizaron mediante la prueba t de Student. El resultado de una cierta dosis del compuesto se considera "+" cuando la diferencia en el peso del tumor es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). 2) análisis histológico: se usaron tres parámetros histológicos para puntuar las muestras. A) necrosis tisular: la imagen de cada muestra a 40X bajo un microscopio de campo brillante se tomó usando la cámara digital MagnaFire (Optronics, EE.UU.) y se almacenó en un ordenador. Las áreas de necrosis en las imágenes se midieron usando Photoshop y se calcularon como Longitud x Anchura, y luego se expresaron como porcentaje sobre el área total de la muestra. La necrosis total del tejido se puntuó utilizando una puntuación de 0 a 2+. En resumen, la ausencia de necrosis se puntúa 0 (< 5 %), 1+ indica necrosis tisular media (5-25 %), 2+ necrosis tisular alta (> 25 %). Solo los casos 2+ se consideraron positivos "+" para la puntuación total final. B) Celularidad tisular: el área de baja celularidad en las muestras tratadas se definió como > 30 % menos núcleo que el área similar en la muestra de control. La imagen de cada muestra a 40X bajo un microscopio de campo brillante se tomó usando la cámara digital MagnaFire (Optronics, EE.UU.) y se almacenó en un ordenador. Las áreas de baja celularidad en las imágenes se midieron usando Photoshop y se calcularon como Longitud x Anchura, y luego se expresaron como porcentaje sobre el área total de la muestra. La integridad total del tejido se puntuó utilizando una puntuación de 0 a 2+. En resumen, la buena integridad del tejido se puntúa 0 (< 5 %), 1+ indica integridad media del tejido (5-25 %), 2+ integridad baja del tejido (> 25 %). Todos los casos 1+ y 2+ se consideraron positivos "+" para la puntuación total final. C) Infiltración de células inflamatorias: los portaobjetos se evaluaron mediante microscopía de campo brillante. Se contaron al menos 100 células por visualización y se calculó el número de células inflamatorias por 100 células totales como porcentaje para cada muestra. La infiltración de células inflamatorias se determinó por la diferencia entre el porcentaje de las muestras tratadas con la de la muestra de control y se puntuó semicuantitativamente usando la puntuación de 0 a 3+. En resumen, la ausencia o muy poca diferencia en la infiltración de células inflamatorias se puntúa 0 (< 5 %), 1+ indica un nivel medio de infiltración de células inflamatorias (5-25 %) y 2+ indica altos niveles de infiltración de células inflamatorias (> 25 %). Todos los casos 1+ y 2+ se consideraron positivos "+" para la puntuación total final. La puntuación histológica final fue la suma de las puntuaciones de los tres parámetros anteriores, expresada como "-" a "++++". Cualquier compuesto con un "+" en la medición del peso del tumor o una puntuación histológica de "+" o más serán buenos candidatos potenciales para el tratamiento local de los neurofibromas. Los compuestos que cumplen dichos criterios son: agentes alquilantes (por ejemplo, tiotepa, carboplatino), antimetabolitos o análogos de nucleósidos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, sangivimicina, tubercidina), inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, podofilotoxina), inhibidores de los microtúbulos (por ejemplo, mebendazol), agentes esclerosantes (por ejemplo, bleomicina, doxiciclina), agentes antiinflamatorios o agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, diclofenaco), agentes que modulan la transcripción génica (inhibidores de la HDAC, tales como tricostatina A, ácido valprórico), agentes quimiopreventivos (por ejemplo, retinoides tales como la fenretinida), alquilfosfolípidos (por ejemplo, miltefosina), inhibidores de HSP90 (por ejemplo, derivados de geldanamicina tales como 17-AAG, radicicol y análogos).

Los compuestos/agentes anteriores se analizaron usando uno o más de los ensayos anteriores para seleccionar agentes útiles en la presente invención para tratar neurofibromas: los ensayos preferentemente se ejecutan en un orden particular y cuando se obtienen "resultados positivos", entonces se realiza el siguiente ensayo y así sucesivamente. Por ejemplo, si se analiza un agente en el ensayo de proliferación celular y es positivo según los criterios descritos anteriormente, entonces este agente se analiza en el ensayo de explante, y si es positivo de acuerdo con los criterios anteriores, entonces este agente se analiza en el ensayo de xenoinjerto. Si los tres ensayos dan como resultado resultados positivos basados en los criterios para un agente o compuesto específico, entonces cabe esperar que este agente sea un buen candidato para el tratamiento exitoso de neurofibromas, específicamente NF1). Además, para los compuestos que se cree que tienen mecanismos de acción no de células autónomas (por ejemplo, inmunomodulador o antiangiogénesis) o desconocidos, se espera que sean buenos candidatos para el tratamiento exitoso de neurofibromas si se obtienen resultados positivos en modelos de xenoinjerto, o en los ensayos clínicos de prueba de principio con pacientes con NF1, si es posible.

## II. Estudios *in vivo*

### Diseño de estudio general para el tratamiento local de neurofibromas con un agente o compuesto

#### A. Administración intralesional

El estudio fue un estudio de prueba de concepto, prospectivo, de seguridad y eficacia del efecto de los fármacos administrados por vía intralesional administrados una vez a la semana a 3 neurofibromas cutáneos diana durante 4 semanas consecutivas. Seis sujetos fueron inscritos. Todos los sujetos tenían el diagnóstico de NF1 y presentaban al menos 6 neurofibromas cutáneos de 0,5 a 1,5 cm, inclusive, en la espalda. Todos los sujetos tenían entre 18 y 65 años de edad, inclusive. Por lo demás, todos los sujetos gozaban de buena salud o tenían condiciones médicas concomitantes estables controladas adecuadamente por un médico de atención primaria. Los sujetos inscritos no demostraron anomalías clínicamente significativas tanto en el laboratorio como en el examen físico, aparte de las características de NF1. Después del examen y la inscripción, todos los sujetos recibieron un volumen definido (basado en el tamaño de la lesión) de fármaco intralesional una vez a la semana en 3 neurofibromas cutáneos diana

que tienen de 0,5 a 1,5 cm de diámetro, inclusive, en su dimensión más grande. Cada neurofibroma cutáneo diana era de un tamaño diferente, con uno de un diámetro de 0,5 a 0,8 cm, un segundo entre 0,81 y 1,2 cm de diámetro y un tercero de 1,21 a 1,5 cm de diámetro. Concomitantemente, tres neurofibromas cutáneos de control que se encuentran en el torso y/o apéndices del mismo intervalo en tamaños recibieron solución salina normal estéril. Todas las lesiones previas a la inyección se anestesiaron localmente con lidocaína al 1 % y epinefrina 1:100.000. Durante el periodo de estudio, los sujetos recibieron 4 inyecciones intralesionales semanales en las 6 lesiones (las 3 lesiones diana que recibieron el fármaco, las 3 lesiones control que recibieron solución salina normal), y se siguieron todas las semanas durante la recepción de la medicación del estudio y tres semanas después de que se hubiera administrado la última dosis. En cada visita, los sujetos se sometieron a exámenes físicos, con el registro de los eventos adversos y los medicamentos concomitantes, y la medición y la fotografía de las lesiones diana y de control. La evaluación incluyó las dimensiones medidas exactas (en dos ejes) de las dos lesiones evaluadas. La fotografía implica imágenes digitales estandarizadas de las lesiones diana y de control (acompañadas por una regla) sin ninguna característica de identificación del sujeto representado. Para cada sujeto, la fotografía suponía una distancia focal, una iluminación y un ángulo de exposición constantes trasladados de una visita a otra. En cada visita, se le preguntó a cada sujeto sobre los posibles efectos secundarios de la recepción de la medicación del estudio durante su administración o entre visitas, incluyendo dolor, prurito, irritación, decoloración, ulceración o cualquier otro signo o síntoma nuevo, ya sea local o distante de las lesiones diana y de control, que no estuviera presente al inicio del estudio.

En uno de los estudios de inyección local, en el que la doxiciclina fue el fármaco del estudio, el 89 % de los tumores inyectados con doxiciclina mostraron una eliminación parcial o completa del neurofibroma dérmico, mientras que todos los controles no mostraron cambios. De forma similar, en otro estudio que utilizó diclofenaco como fármaco de estudio, el 48 % de los tumores inyectados con diclofenaco mostraron una eliminación parcial o completa del neurofibroma dérmico, mientras que todos los controles no mostraron cambios.

#### B. Administración tópica

Los sujetos con neurofibromas se seleccionan como se ha descrito anteriormente en A, y se realizan controles similares con neurofibromas no tratados en el mismo sujeto. Los métodos alternativos de administración incluyen la aplicación tópica aplicando una composición que contiene uno o más de los agentes descritos en la presente memoria, en combinación con gel al 5 % en cantidades suficientes para recubrir la piel de un neurofibroma para cubrir el tumor una vez al día durante 21 días. Adicionalmente, la aplicación tópica se realiza aplicando un dispositivo de dermoabrasión en el que las microagujas del dispositivo se recubren con la composición que comprende el agente a la piel que cubre el tumor una vez al día durante 7 días.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un neurofibroma dérmico, un neurofibroma subdérmico o un neurofibroma plexiforme superficial en un sujeto para su administración local, composición que comprende (a) al menos un agente para disminuir el impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto, en el que el agente es no carcinogénico, y opcionalmente (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable que ayuda a transportar el agente al tumor y donde se mantiene preferentemente durante un periodo de tiempo suficiente para afectar negativamente al neurofibroma, en el que el agente no carcinogénico se selecciona del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y un antibiótico de tetraciclina.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha administración local es la inyección intralesionalmente de dicha composición en el tumor.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha administración local es la aplicación tópicamente de dicha composición a la superficie de la piel en la región del tumor, y en el que dicho excipiente ayuda a transportar el agente a través de la piel y hacia el tumor y preferentemente mantiene el agente sobre la piel del sujeto.
- 20 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antibiótico de tetraciclina es doxiciclina.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) es diclofenaco.
- 25 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 5, en la que el excipiente farmacéuticamente aceptable incluye un agente de penetración en la piel.
- 30 7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su administración tópica.
- 35 8. Uso de al menos un agente, en el que el agente es no carcinogénico, para disminuir el impacto negativo del neurofibroma sobre el sujeto con un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable que ayuda a transportar el agente o agentes a través de la piel hacia el tumor y preferentemente mantiene el agente o agentes sobre la piel del sujeto durante un periodo de tiempo, en el que el agente no carcinogénico se selecciona del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y un antibiótico de tetraciclina para la fabricación de un medicamento para tratar tópicamente un neurofibroma dérmico, un neurofibroma subdérmico o un neurofibroma plexiforme superficial.
- 40 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el antibiótico de tetraciclina es doxiciclina.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) es diclofenaco.
11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el excipiente farmacéuticamente aceptable incluye un agente de penetración en la piel.