

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 169**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/135** (2006.01)

**A61K 31/065** (2006.01)

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2005 PCT/NL2005/000551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2007 WO07013793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2005 E 05769178 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 1909778**

54 Título: **Compuestos de monofenol, bencenodiol, o sulfhidrido para uso en el tratamiento de melanomas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.03.2018**

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS BIJ DE  
UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM (50.0%)  
Meibergdreef 9  
1105 AZ Amsterdam, NL y  
ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.  
LUMC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WESTERHOF, WIETE;  
LUITEN, ROSALIE MARGARETHA y  
MELIEF, CORNELIS JOSEPH MARÍA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones :**

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

ES 2 661 169 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos de monofenol, bencenodiol, o sulfhidrido para uso en el tratamiento de melanomas

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la medicina, en particular a los campos de inmunología, autoinmunidad y autoantígenos. La invención también se refiere a la modificación química de antígenos y métodos y medios para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, en particular melanoma.

10

**Antecedentes de la invención**

En las últimas décadas, la incidencia de melanoma ha aumentado a un ritmo más rápido que el de cualquier otro tumor sólido (1). La incidencia más elevada se ha observado en Australia y Nueva Zelanda (27,9/100.000 entre los hombres y 25,0 entre las mujeres) y en Norteamérica (10,9/100.000 entre los hombres y 7,7 entre las mujeres). En 2001, se calculó que se podrían diagnosticar 51 400 casos de melanoma invasivo. (2) El reconocimiento precoz y la extirpación quirúrgica del tumor primario proporcionan la mejor oportunidad para obtener una cura. Sin embargo, el pronóstico asociado con melanoma más avanzado sigue siendo deficiente. Los pacientes que presentan lesiones primarias gruesas, melanoma en estadio IIB/C de acuerdo con el American Joint Committee on Cancer (AJCC) y las metástasis ganglionares regionales (melanoma en estadio III según AJCC) tienen una supervivencia informada a 5 años que varía entre un 30 y 70 %. Esto está relacionado con las altas tasas de fracaso asociadas con la terapia quirúrgica sola en casos local y regionalmente avanzados. Se ha informado que el riesgo de recurrencia después de la cirugía es tan alto como un 60 % para pacientes con melanoma estadio IIB/C y un 75 % para pacientes con melanoma en estadio III (3). Combinando esto, ha sido la falta de una terapia adyuvante eficaz, en particular la eficacia limitada de agentes quimioterapéuticos citotóxicos, contra el melanoma. Recientemente, se ha informado que el uso de altas dosis de interferón en el entorno adyuvante mejora tanto la supervivencia sin enfermedad como la general (4, 5). Los beneficios del interferón, sin embargo, aún se están debatiendo, y el tratamiento con interferón no está exento de costes, riesgos y toxicidad significativos. Los resultados conseguidos con el interferón destacan el potencial del sistema inmunitario para prevenir la recurrencia después de la resección quirúrgica de melanomas de alto riesgo.

15

20

25

30

El melanoma se ha convertido en el modelo principal para el desarrollo de inmunoterapias por varias razones. La evidencia histopatológica de regresión tumoral se observa con frecuencia dentro de las muestras de melanoma primario, junto con la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor, lo que sugiere un papel destacado del sistema inmunitario en el melanoma (6). Las células de melanoma se adaptan fácilmente al cultivo de tejidos, lo que da como resultado la creación de paneles de estudio de líneas celulares de melanoma. La escasez de terapias eficaces (quimioterapia, radiación) ha dado como resultado un umbral más bajo para probar terapias inmunológicas en pacientes con melanoma (7, 8).

35

40

45

Por todas estas razones, se ha realizado un esfuerzo importante para tratar el melanoma maligno usando modalidades inmunológicas. El uso de inmunoterapia se puede clasificar como activo o pasivo. La inmunoterapia pasiva es el uso de anticuerpos o células que se han sensibilizado previamente para hospedar antígenos tumorales. El hospedador no necesita remontar una respuesta inmunológica, el agente medirá de forma directa o indirecta la muerte tumoral. Por otro lado, la inmunoterapia activa es el uso de agentes que harán que el hospedador desarrolle una respuesta inmunológica. Además esto se puede dividir en inmunoterapias activas inespecíficas y específicas. Los agentes no específicos son aquellos que estimulan el sistema inmunitario de forma global, pero no recuperan células efectoras específicas. La inmunoterapia activa específica está diseñada para provocar una respuesta inmunológica a uno o más antígenos tumorales.

50

55

Las estrategias actuales para la inmunoterapia del melanoma incluyen la inducción o el aumento de las respuestas inmunológicas contra los antígenos tumorales presentados por las proteínas melanosómicas tales como tirosinasa, proteínas relacionadas con la tirosinasa TRP1 y TRP2, gp100 y MART-1. En trastornos despigmentantes autoinmunitarios han observado respuestas inmunológicas potentes en seres humanos y animales contra los melanocitos y estos antígenos, que comprenden melanocitos que erradican las respuestas de CTL así como las respuestas humorales.

El vitíligo es uno de esos trastornos despigmentantes adquiridos, y se caracteriza por la pérdida de melanocitos de la epidermis. Se distinguen varios tipos de vitíligo de acuerdo con la distribución de las lesiones acrómicas. Una o más lesiones con un patrón casi dermatómico son características para el vitíligo unilateral, mientras que esta distribución unilateral está ausente en el vitíligo focal. Ambos son tipos localizados de vitíligo. El vitíligo generalizado se caracteriza por múltiples lesiones dispersas en un patrón de distribución simétrica. El curso de la enfermedad es impredecible, pero a menudo es progresivo con fases de despigmentación estabilizada (9). Un vitíligo extendido que lesiones que se agrandan o el desarrollo de nuevas lesiones se define como vitíligo activo.

60

65

La asociación con trastornos autoinmunes y anticuerpos específicos de órganos, así como el hecho de que las terapias de repigmentación no quirúrgicas tienen efectos inmunomoduladores también respaldan la idea de una

patogénesis autoinmune de la enfermedad. Los anticuerpos humorales generalmente se consideran un epifenómeno. El progreso en la comprensión de la patogenia del vitíligo surge de los estudios sobre los fenómenos locales que conducen o están relacionados con el proceso de despigmentación. La piel de aspecto normal adyacente al área despigmentada se caracteriza histológicamente por cambios degenerativos en los melanocitos, cambios vacuolares de las células basales, la presencia de una infiltración linfocítica en la epidermis y la dermis, así como melanófagos en la dermis superior (10-12). En el vitíligo inflamatorio progresivo, que se caracteriza por lesiones acrómicas rodeadas por un borde rojo elevado, la infiltración linfocítica continúa en la dirección de la piel que todavía contiene melanocitos, sugiriendo un papel del infiltrado inflamatorio en la desaparición de melanocitos (13). Un estudio reciente localizó linfocitos T citotóxicos para CLA+ en yuxtaposición con la desaparición de melanocitos en la piel perilesional del vitíligo generalizado. Además, se detectó una expresión epidérmica focal de ICAM-1 y HLA-DR en el sitio de interacción entre los linfocitos T y los melanocitos dirigidos a la piel (14). La expresión de HLA-DR implica la participación de linfocitos T limitados a MHC de clase II en el proceso patogénico (15). Los clones de linfocitos T perilesionales (TCC) obtenidos a partir de pacientes con vitíligo presentaban un perfil predominante de secreción de citoquina similar al Tipo 1, mientras el grado de polarización de Tipo 1 en TCC obtenidos a partir de piel sin evolucionar se correlacionaba con el proceso de destrucción de melanocitos microscópicamente observada *in situ*. El análisis detallado de amplio espectro de citoquinas producidas por TCC CD4+ y CD8+ obtenidos a partir de muestras perilesionales y no lesionales confirmó la polarización hacia el Tipo 1 al igual que en los compartimentos tanto CD4 como CD8, que coincidían con el proceso de despigmentación observado localmente en la piel. Además, también se analizaron CD8+ TCC obtenidos a partir de dos pacientes para determinar la reactividad contra los melanocitos autólogos. La reactividad citotóxica de los antimelanocitos se observó entre TCC CD8+ aislados de biopsias perilesionales de dos pacientes con vitíligo. Por último, en dos de cinco pacientes, el análisis con tetrámero reveló la presencia de altas frecuencias de linfocitos CD8 T específicos de Mart-1 en líneas de linfocitos T obtenidos a partir de piel perilesional (16).

Una forma distintiva de vitíligo es el vitíligo por contacto u ocupacional (17, 18). Esta forma es única porque su aparición se correlaciona con la exposición a ciertas sustancias químicas que inducen leucoderma químico. El vitíligo por contacto/ocupacional es distinto del leucoderma químico en que la despigmentación cutánea inicial se extiende desde el sitio de contacto químico y posteriormente se desarrolla un vitíligo generalizado progresivo (19). Existen evidencias anecdóticas y experimentales que demuestran que ciertos productos químicos ambientales son selectivamente tóxicos para los melanocitos, tanto en cultivo como *in vivo* (20, 21, 22) y, por lo tanto, son los responsables de iniciar el vitíligo (19). La mayoría de estas toxinas son derivados aromáticos o alifáticos de monofenoles y bencenodíoles, que contienen un anillo fenilo con 1 o 2 restos hidroxilo, que pueden estar en las configuraciones *orto*- (1 y 2, catecoles), *meta*- (1 y 3; el 1,3 bencenodiol también se denomina resorcinol) y *para*- (1 y 4), tal como *para*-hidroxibenceno, también denominado hidroquinona (Figura 1). La Tabla 1 enumera una selección de monofenoles, bencenodíoles y/o catecoles preferentes (o compuestos de 1,2 dihidroxifenilo) y sulfhidrilos capaces de despigmentar la piel y/o iniciar el vitíligo. Algunos de estos compuestos se han añadido a cremas blanqueadoras, productos usados para retirar lesiones hiperpigmentadas. De forma interesante, estas cremas no son tóxicas para los melanocitos de todos los individuos. Incluso en dosis elevadas, solo un subconjunto de seres humanos sufren es pigmentación como respuesta a la aplicación. La exposición de la piel a ciertos fenoles y catecoles tales como Éter monobencílico de hidroquinona (MBEH), 4-terc-butilfenol (TBP) y 4-terc-butilcatecol (TBC) causa leucoderma y puede inducir despigmentación de tipo vitíligo. Muchos de los casos han sido informados por trabajadores que estuvieron expuestos a estos compuestos en las industrias de polímeros o cuero. MBEH, TBP, TBC y otros monofenoles o bencenodíoles son análogos de sustrato que se pueden oxidar con enzimas que tienen actividad de tirosinasa, produciendo quinonas y en particular compuestos intermedios de ortoquinona, compuestos que son altamente reactivos y que reaccionan rápidamente con restos de histidina y cisteína en proteínas. En particular, algunas ortoquinonas de alta reactividad reaccionarán inmediatamente con restos cisteína o preferentemente con restos de restos de histidina o en las cercanías de o más preferentemente dentro del sitio catalítico de la enzima tirosinasa.

Hasta ahora los resultados del tratamiento para el melanoma metastásico han sido desalentadores. La quimioterapia con agente único produce tasas de respuesta que varían de un 8 % a un 15 %, y la quimioterapia de combinación, de un 10 % a un 30 %. Estas respuestas generalmente no son duraderas. La inmunoterapia, que usa interferón (IFN $\gamma$ ) o en particular de interleuquina (IL)-2 en dosis elevadas, también ha mostrado una baja tasa de respuesta de aproximadamente un 15 %, aunque a menudo es más duradera. De hecho, se ha informado una tasa de curación pequeña pero finita de aproximadamente un 5 % con dosis altas de IL-2. Los estudios de fase II de la combinación de quimioterapia basada en cisplatino con IL-2 e interferón-alfa, conocida como bioquimioterapia, han mostrado tasas de respuesta generales que varían de un 40 % a un 60 %, con remisiones completas duraderas en aproximadamente un 8 % a un 10 % de los pacientes. Aunque los resultados de los estudios de fase II de una sola institución fueron alentadores, los estudios multicéntricos de fase III han informado resultados contradictorios, que en general han sido predominantemente negativos. Además, la administración de IL-2 e IFN está asociada con múltiples efectos secundarios, y solo deberían administrarlos los médicos con experiencia en la gestión de las terapias de este tipo.

Riley (23, 24) aplicó el compuesto de fenol despigmentante 4-HA (4-hidroxianisol) como un agente quimioterapéutico en melanoma, sin éxito. Los intentos de usar estos agentes para el tratamiento del melanoma diseminado han fracasado debido a problemas de farmacocinética desfavorable, toxicidad primaria o acciones farmacológicas de

sustratos análogos y toxicidad de los metabolitos hepáticos. Las infusiones intraarteriales en los miembros inferiores dieron lugar a una grave toxicidad renal y hepática.

5 Es evidente que se necesitan nuevas estrategias para mejorar los resultados clínicos del melanoma. El uso de los autoantígenos responsables del trastorno autoinmune vitíligo para la inducción de una respuesta antitumoral se ha investigado desde hace mucho tiempo. Hasta ahora, esto no ha producido mejores terapias y medicamentos para el tratamiento del melanoma. De forma análoga, los estudios de Riley y otros sobre el uso de compuestos capaces de inducir el vitíligo ocupacional y la citotoxicidad contra los melanocitos para el tratamiento del melanoma no han tenido éxito. El documento US5395611A desvela composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la pigmentación de la piel y el melanoma, que comprende derivados de 4-S-cisteaminilfenilo, compuestos de fenol que son menos tóxicos que el fenol o la hidroquinona conocidos como agentes de despigmentación (columna 1, líneas 25-56; columna 2, líneas 56 -60). Se desvelan la administración tópica y las combinaciones con hidrocortisona (columna 6, línea 31). El documento WO9116302A1 desvela despigmentación fenólica y agentes antimelanoma en combinación con hidrocortisona para el tratamiento del melanoma. El documento US5925332A desvela acil derivados de tioéster aminas fenólicas y su uso para bloquear la síntesis de melanina para el tratamiento de melanoma, también en combinación con hidrocortisona. El problema de estos tratamientos es que su eficacia es limitada. Los inventores actuales intentaron superar el *status quo* actual. La presente invención se basa en nuevas ideas sobre cómo los antígenos presentes en los melanocitos se pueden modificar químicamente y activar *in situ*, proporcionando nuevos métodos y medios para el tratamiento de neoplasias que expresan tirosinasa tales como melanoma.

### Sumario de la invención

25 La administración de ciertos fenoles, que comprenden monofenoles, en particular monofenoles y bencenodiolos para-hidroxilados, meta-hidroxilados, orto-hidroxilados, más en particular catecoles (orto: 1,2), recorcinolos (meta: 1,3) e hidroquinonas (para: 1,4), también posiblemente sustituidos con cadenas laterales. Estos compuestos de fenol de la invención por definición deben ser capaces de funcionar como análogos de sustrato para tirosinasa, para el tratamiento de enfermedades relacionadas con melanocitos tales como trastornos hiper-pigmentarios, y han sido sometidos a ensayo por varios científicos y expertos en medicina (véase la tabla 1). También se sabe que la adrenalina, noradrenalina y semiquinonas de estrógenos son sustrato para enzimas tirosinasa.

35 Aunque el 4-Hidroxianisol se usó en el tratamiento del melanoma metastásico, se demostró que la infusión intra arterial de altas dosis de 4-Hidroxianisol no era eficaz y conducía a graves sucesos tóxicos. La infusión intra arterial de monofenoles y bencenodiolos evita al melanocito en la piel o la célula de melanoma en la piel o en la lesión maligna. La invención actual se basa en parte en la observación de que es necesario metabolizar monofenoles o bencenodiolos en quinonas reactivas, en particular orto-quinonas y compuestos intermedios reactivos relacionados, lo que se provoca por la oxidación de monofenoles y bencenodiolos mediante proteínas que presentan actividad de tirosinasa, tal como tirosinasa humana y las proteínas relacionadas, TRP1 y TRP2. Aunque las sustancias y los compuestos reactivos producidos son tóxicos y pueden inducir la muerte celular directamente, es más relevante de acuerdo con la presente invención que funcionan como haptenos que se llegan a unir de forma covalente a las enzimas tirosinasa, en particular a restos de histidina, y en menor medida a restos de cisteína, en o cerca del sitio catalítico de proteínas que presentan actividad de tirosinasa, es decir, tirosinasa, TRP1 y TRP2.

45 A diferencia de las altas dosis de sustratos sustitutos de tirosinasa usados en el caso de infusiones intra arteriales como una quimioterapia, se logra una concentración sistémica mil veces más baja en la presente invención mediante la aplicación local de los compuestos activos sobre las lesiones o la inyección en la lesión del melanoma, para provocar una sensibilización del sistema inmune contra las células de melanoma. La infusión intraarterial de monofenoles y bencenodiolos, en particular catecoles, evita la célula de melanoma en la piel o en la lesión maligna. La invención desvela el uso de proteínas 'haptinizadas', en particular proteínas que presentan una actividad de tirosinasa y fragmentos de esas proteínas, que se pueden aplicar para provocar respuestas inmunes *in vivo* o *in vitro* y para la fabricación de medicamentos o vacunas. En realizaciones en particular de la invención, la reacción del sistema inmune de un sujeto a tratar para neoplasias de células pigmentarias tales como melanoma, se estimula adicionalmente mediante inmunomoduladores aplicados sobre o en la lesión, por ejemplo compuestos que provocan una respuesta inflamatoria local. En una realización más preferente, el método y los medicamentos de la invención se aplican en conjunto con etapas para disminuir la presencia o la actividad de linfocitos T reguladores. Los linfocitos T reguladores funcionan para prevenir la autoinmunidad y obstaculizar los intentos de provocar una respuesta inmunogénica contra los autoantígenos obtenidos a partir de melanocitos tales como tirosinasa y proteínas relacionadas con tirosinasa TRP1 y TRP2. La invención proporciona diferentes medidas y etapas opcionales para minimizar la obstrucción de linfocitos T reguladores en el proceso de generación de una respuesta inmunogénica celular contra los autoantígenos modificados de la invención.

### Descripción detallada

65 El síndrome de vitíligo ocupacional proporciona información sobre autoantígenos que pueden ayudar a remontar una respuesta inmune eficaz contra cualquier célula que comprenda actividad de tirosinasa y/o un metabolismo de melanina, en particular células de melanoma maligno, que implican respuestas a linfocitos T y opcionalmente

respuestas a linfocitos B.

La hipótesis de que los monofenoles y bencenodíoles son sustratos de la tirosinasa y que se convierten en quinonas reactivas como la especie reactiva responsable de la toxicidad de los melanocitos generalmente está aceptada (17), aunque genera controversia en otros (25). Los monofenoles y los bencenodíoles son estructuralmente similares a la tirosina, el sustrato de la tirosinasa que inicia la ruta bioquímica para la síntesis de melanina (Figura 2) (22). Los derivados de monofenoles y bencenodíoles (denominados sustratos sustitutos) compiten con la tirosina para la hidroxilación con tirosinasa e interfieren con la síntesis de melanina (26, 27, 28, 29) y los radicales libres correspondientes de semiquinona se generan por la acción catalítica de la tirosinasa en estos derivados fenólicos/catecólicos.

La tirosinasa (E.C.1.14.18.1) presenta una cinética inusual, la oxidación de su sustrato primario, la fenol tirosina monohídrica, se caracteriza por un periodo de latencia (30), que se prolonga al aumentar la concentración de sustrato. El logro de la velocidad máxima de reacción depende de la recuperación de la enzima en el estado met. En la enzima met, los dos átomos de cobre en el sitio activo están en la forma de Cu(II) y no pueden formar un complejo con oxígeno molecular (31). El proceso de "recuperación" implica la reducción de los átomos de cobre del sitio activo a la forma Cu(I), que permite la unión del oxígeno en una conformación peroxi (32). Esta enzima oxi es capaz de catalizar la oxidación de sustratos de fenol monohídrico tales como la tirosina. Aunque se conocen agentes reductores alternativos (33, 34, 35), la reducción de los átomos de cobre en el sitio activo se produce de manera más eficaz mediante sustratos de fenol dihidrólico (tales como catecólicos) tales como 3,4-dihidroxiifenilalanina, que se oxidan a la ortoquinona correspondiente en el proceso (dopaquinona). Por lo tanto, la autoactivación de la tirosinasa se explica por la generación de catecol activante en el proceso de oxidación de fenol monohídrico y la prolongación del periodo de latencia con aumento de los resultados de la concentración de sustrato a partir de la competencia por el sitio activo entre el fenol monohídrico y el catecol que contiene enzimas (36). Las proteínas TRP1 y TRP2 altamente relacionadas presentan diferentes especificidades de sustrato y cinética de la tirosinasa. Los inventores también han informado que usan diferentes cofactores tales como  $Zn^{2+}$  o  $Fe^{2+}$ . Aunque la tirosinasa cataliza la generación limitante de la tasa de L-dopaquinona a partir de L-tirosina y también es capaz de oxidar la L-DOPA a L-dopaquinona, la TRP1 de ratón, pero no la tirosinasa, cataliza la oxidación del compuesto intermedio indólico, ácido 5,6-dihidroxiindolo-2-carboxílico (DHICA) en el correspondiente ácido 5,6-indoloquinona-2-carboxílico, estimulando de ese modo la incorporación de unidades de DHICA en eumelanina. Las actividades catalíticas de las enzimas melanogénicas humanas aún se debaten. Sin embargo, es evidente que también TRP1 y TRP2 muestran reactividad hacia la mayoría o todos los monofenoles y bencenodíoles, en particular catecoles, que también son análogos de sustrato de tirosina que pueden ser metabolizados por la tirosinasa.

Los inventores actuales observaron la histología de la piel de pacientes con vitíligo sometidos a terapia de despigmentación con Monobenzona (éter monobencílico de hidroquinona o p-(benciloxi)fenol) y observaron un infiltrado denso que consiste principalmente en células CD8<sup>+</sup> y macrófagos que indican una respuesta inmune mediada por células de tipo retardado y sin granulocitos, que podrían haber estado allí en el caso de una reacción tóxica (ortoérgica). Los melanocitos y los queratinocitos *in vitro* son igualmente sensibles a los efectos tóxicos de la Monobenzona, pero *in vivo* se observa que una respuesta inflamatoria con eritema, edema y descamación solo se observa en la piel pigmentada. En la piel despigmentada no se produce reacción. Esto implica que la reacción inflamatoria está dirigida hacia algo, que solo está presente en los melanocitos, por ejemplo, tirosinasa, TRP1 y/o TRP2. Sin embargo, se ha informado que los autoanticuerpos contra tirosinasa, TRP1 y TRP2, se producen con bajas frecuencias, o no se producen, en pacientes con vitíligo (37, 38, 39, 40, 41).

Para establecer una respuesta inmune eficaz contra autoantígenos, puede ser necesario modificar un autoantígeno a medida que el sistema inmune selecciona el reconocimiento de autoantígenos. Los linfocitos tanto B como T experimentan selección positiva y negativa en los órganos linfoides primarios, en particular en el timo. La selección positiva requiere señalización a través del receptor de antígeno para que la célula sobreviva. Los linfocitos B en desarrollo se seleccionan positivamente cuando el receptor pre-B se une a su ligando. Los linfocitos T en desarrollo se seleccionan positivamente por su capacidad de unirse tanto a MHC como al péptido. La selección negativa se refiere a que la unión al receptor da como resultado la muerte celular. Los linfocitos tanto B como T inmaduros se seleccionan negativamente si se unen al propio antígeno. Por lo tanto, para establecer una respuesta inmune eficaz contra autoantígenos, un enfoque podría ser cambiar o modificar ligeramente un autoantígeno. Esto se produce aparentemente en el organismo en el caso de diversas enfermedades autoinmunes, a menudo desencadenadas por una infección o por exposición a agentes químicos. Hasta ahora no se conoce la naturaleza exacta de los autoantígenos alterados de este tipo. Sin embargo, ya se sabe mucho sobre la interacción de (orto-)quinonas y tirosinasa, que puede ser provocada por la exposición a diversos monofenoles y bencenodíoles, cuyos ejemplos principales se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1. Agentes químicos seleccionados asociados con vitiligo por contacto/ocupacional Adaptados a partir de Miyamoto y Taylor (22).

<b>Derivados de fenol/catecol más potentes</b>	<b>Derivados de fenol/catecol adicionales</b>
Éter monobencílico de hidroquinona	Éter monometílico de hidroquinona (p-metoxifenol; p-hidroxianisol)
Hidroquinona (1,4-dihidroxi-benceno; 1,4-bencenodiol; quinol; p-hidroxifenol)	Éter monoetilico de hidroquinona (p-etoxifenol)
p-terc-Butilcatecol	p-Fenilfenol
p-terc-Butilfenol	p-Octilfenol
p-terc-Amilfenol	p-Nonilfenol
	p-Isopropilcatecol
	p-Metilcatecol
	Hidroxitolueno butilado
	Hidroxianisol butilado
	Pirocatecol (1,2-bencenodiol)
	p-Cresol
	<i>Sulfhidrilos</i>
	Clorhidrato de $\beta$ -mercaptoetilamina (cisteamina)
	Clorhidrato de N-(2-mercaptoetil)-dimetilamina
	Ácido sulfanólico
	Diclorhidrato de cistamina
	Clorhidrato de 3-mercaptopropilamina

- 5 El vitiligo ocupacional causado, por ejemplo por la monobenzona (MBEH) o por cualquiera de los monofenoles y bencenodiolos que se enumeran en la tabla 1, presenta un ejemplo de cómo se van a cambiar los autoantígenos implicados en el metabolismo de la melanina. MBEH y otros compuestos relacionados son sustratos de tirosinasas, capaces de reaccionar en el sitio catalítico de la enzima, y culminar en una reacción 'suicida' con el sitio catalítico de las enzimas. Después de una reacción catalítica, la monobenzona se oxida en una ortoquinona (bencil oxi ortoquinona). Este compuesto extremadamente reactivo se une covalentemente a los restos de histidina en el sitio activo de la enzima de mamífero (42). El compuesto o sus restos están atrapados en el dominio catalítico de la enzima y esto conduce a la inactivación suicida de la enzima. Cuando un monofenol tal como MBEH o 4-PTB o un bencenodiol o cualquier otro compuesto relacionado con los ejemplos enumerados en la tabla 1, se une covalentemente a la tirosinasa, esto dará lugar a antígenos modificados.
- 10
- 15 La presente invención se basa en la observación de que el complejo de la enzima y fenol; monofenol o bencenofenol, se puede metabolizar posteriormente dentro de un proteasoma de una célula que comprende actividad de tirosinasa y se puede tratar con monofenol o bencenodiol, tal como un melanocito, y se será presentado mediante moléculas MHC de clase I en su superficie. Las células de Langerhans, las células dendríticas en la piel, recogen los antígenos y los procesan en un oligómero de 8 meros o 9 meros (o un polipéptido de incluso 10 a 12 o más aminoácidos). En el ganglio linfático regional, este polipéptido específico se presentará posteriormente a las células de memoria dentro de las limitaciones del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. A continuación se generan células citotóxicas CD8<sup>+</sup>, que tienen propiedades de migración dirigida, haciendo estadios de la respuesta inmune en el área original definida por receptores en células endoteliales de pequeños vasos sanguíneos que causan las extravasaciones de estos linfocitos T citotóxicos. A continuación la despigmentación de tipo vitiligo se producirá en la región por el ataque del sistema inmune celular contra las células que presentan los autoantígenos modificados.
- 20
- 25

En el caso de la sensibilización deseada del sistema inmune de un paciente con melanoma con una composición de acuerdo con la invención, que comprende compuesto de monofenol o bencenodiolos, la citotoxicidad mediada por

linfocitos T se dirigirá hacia las células que presenten los autoantígenos modificados, tales como melanocitos, especialmente cuando el compuesto se aplica por vía tópica en la lesión o se inyecta por vía intralesional a dosis relativamente bajas. Será particularmente ventajoso repetir la administración para proporcionar una exposición continua de antígeno modificado al sistema inmune y de ese modo reforzar la respuesta inmune. Más preferentemente, se puede aplicar una formulación de liberación lenta del fenol o catecol, proporcionando una exposición prolongada y sostenida, mientras que al mismo tiempo se evita la toxicidad de altas dosis máximas del compuesto a usar. Durante y después del tratamiento, todas las células que tienen un metabolismo de melanina, incluidos los melanocitos normales en la piel y el cabello, desaparecerán, localmente y/o incluso sistémicamente. Este efecto despigmentante no es deseado, pero en el caso del melanoma maligno y metastásico es un efecto secundario aceptable del tratamiento.

Por lo tanto, en una primera realización, la presente invención proporciona medicamentos para el tratamiento de melanoma y enfermedades, en particular enfermedades neoplásicas, causadas por melanocitos y células de nevus melanocítico que presentan actividad de enzima tirosinasa. La invención enseña el uso de fenoles, en particular ciertos compuestos de monofenoles y bencenodiolos que pueden funcionar como análogos de sustrato de tirosina y que son capaces de reaccionar con enzimas que presentan actividad de tirosinasa a través de compuestos intermedios reactivos, especialmente orto-quinonas y que inactivarán la tirosinasa o proteínas relacionadas y se modificarán a través de enlace covalente. Los monofenoles y bencenodiolos se pueden usar para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de neoplasias que presentan actividad de enzima tirosinasa, tales como, pero no limitado a, células de melanoma y células de nevus melanocítico, por lo que el medicamento es adecuado para administración tópica directa sobre las lesiones que comprenden las células con actividad de tirosinasa. La administración tópica es una característica esencial de la invención, para poner las proteínas involucradas en el metabolismo de la melanina, tales como tirosinasa, TRP1 y TRP2, en contacto directo con la sustancia o sustancias. La administración tópica se puede producir directamente en la piel, en piel normal o sana, o preferentemente sobre, en o alrededor de lesiones sobre o en la piel, es decir, sobre los melanomas o nevus a tratar. La administración sistémica podría requerir dosis más altas y potencialmente tóxicas de los compuestos activos y podría dar como resultado graves efectos secundarios causados por la reacción e interacción prematuras del fármaco en partes, órganos y tejidos del organismo cuando esto no es deseable o útil. Además, la administración sistémica puede conducir a un metabolismo prematuro de los compuestos y/o los compuestos se eliminarán de la circulación, ya que serán eliminados por el hígado y el riñón (efecto de primer paso) y de ese nunca alcanzan sus células diana que tienen actividad de tirosinasa y que se localizan predominantemente en, sobre o debajo de la piel. Las metástasis más alejadas de los melanomas serán alcanzadas por la respuesta a CTL, a través de todo el organismo. El método y las composiciones de acuerdo con la invención están principalmente dirigidos al tratamiento del melanoma, pero también se pueden aplicar para tratar lesiones pre-melanoma, nevus melanocíticos congénitos (por ejemplo, nevus Velloso Gigante), nevus melanocíticos, por ejemplo, nevus atípicos o displásicos, nevus celular azul y nevus de Becker, de los cuales se sabe que todos son capaces de convertirse en malignos.

El compuesto de fenol que se usará se puede seleccionar entre los grupos de mono-fenoles, bencenodiolos y especialmente catecoles de la invención, que en la técnica se sabe que son capaces de inducir vitiligo y se sabe que son sustratos de tirosinasa, TRP1 y/o TRP2. Los monofenoles y bencenodiolos o dihidroxibencenos son compuestos químicos aromáticos en los que uno o dos grupos hidroxilo están sustituidos en un anillo de benceno. Debido a que tienen al menos un grupo hidroxilo unido de forma covalente directamente al átomo de carbono en un anillo de benceno, se encuentran en una clase de compuestos orgánicos llamados fenoles. Hay tres isómeros de bencenodiolos, cada uno de los cuales tiene su propio nombre común o no sistemático como se muestra en la tabla 2 Las sigue a continuación. También se muestran otras diversas formas de nombrar estos tres compuestos químicos:

Tabla 2: bencenodiolos:

isómero <i>orto</i>	isómero <i>meta</i>	isómero <i>para</i>
1,2-bencenodiol	1,3-bencenodiol	1,4-bencenodiol
<i>o</i> -bencenodiol	<i>m</i> -bencenodiol	<i>p</i> -bencenodiol
1,2-dihidroxibenceno	1,3-dihidroxibenceno	1,4-dihidroxibenceno
<i>o</i> -dihidroxibenceno	<i>p</i> -dihidroxibenceno	<i>p</i> -dihidroxibenceno
catecol (o catecol)	resorcinol	hidroquinona
pirocatecol		

Estos tres compuestos son incoloros a sólidos granulares de color blanco a temperatura y presión ambientales, pero después de su exposición al oxígeno se pueden oscurecer. Los tres isómeros tienen la fórmula química  $C_6H_6O_2$ . Al igual que otros fenoles, los grupos hidroxilo en el anillo aromático de un bencenodiol son débilmente ácidos, dependiendo de otros sustituyentes en el anillo fenilo. Cada bencenodiol puede perder un  $H^+$  de uno de los hidroxilos para formar un ion monofenolato o perder un  $H^+$  de ambos para formar un ion difenolato.

La hidroquinona puede experimentar una oxidación leve para convertirse en el compuesto parabenzoquinona,  $C_6H_4O_2$ , denominada a menudo *p*-quinona o simplemente quinona. La reducción de la quinona hace que se

convierta de nuevo en hidroquinona al invertirse esta reacción. Algunos compuestos de naturaleza bioquímica tienen este tipo de sección de hidroquinona o quinona en sus estructuras, tal como Coenzima Q, y pueden experimentar interconversiones redox similares. La hidroquinona tiene una diversidad de usos asociados principalmente con su acción como un agente reductor que es soluble en agua. Se trata de un componente principal en la mayoría de los agentes de desarrollo fotográfico en los que, con el compuesto Metol, reduce los haluros de plata a plata elemental.

Los monofenoles y dihidroxibencenos que pueden funcionar como análogos de sustrato para la tirosinasa pueden tener uno o más sustituyentes del anillo fenilo, que alterarán la reactividad y especificidad del compuesto para su enzima diana de tirosinasa. Los sustituyentes pueden comprender metoxi, etoxi, metilo, etilo, propilo, butilo, amino, carbonilo, fenilo, sulfhidrilo, halógenos y muchos otros grupos o sustituyentes químicos. Los diversos compuestos se pueden diferenciar en su reactividad (bio)química, estabilidad, toxicidad y lo más importante en su inmunogenicidad como un hapteno sobre la tirosinasa. Una selección de ejemplos adecuados de compuestos inductores de vitiligo se enumera en la tabla 1 en la presente memoria descriptiva. De acuerdo con la presente invención, para la haptenización de enzimas tirosinasa el siguiente listado de compuestos de fenol: del grupo de monofenoles y bencenodiolos; fenol, catecol, hidroquinona, 4-terc-butilfenol, 4-terc-amilfenol, 4-terc-butilcatecol, monometil éter de hidroquinona, éter monoetilico de hidroquinona, 4-terc-amilfenol, monobencilo éter of hidroqui-none, 4-fenilfenol, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, 4-isopropilcatecol, 4-metilcatecol, p-cresol, 1,2-bencenodiol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, 4-S-cisteaminilfenol, N-acetil-4-S-cisteaminilfenol. Los compuestos más precedentes son monobenzona (MBEH) y 4-PTB (4-para-terc-butilfenol) que tienen una potencia muy elevada para inducir el vitiligo. Los sulfhidrilos tales como clorhidrato de mercaptoetilamina (cisteamina), clorhidrato de N-(2-mercaptoetil)-dimetilamina, clorhidrato de cistamina, clorhidrato de 3-mercaptopropilamina y ácido sulfónico también son los más adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención.

En otras realizaciones, se pueden usar dos o más compuestos del grupo de monofenoles y bencenodiolos En combinación, de forma simultánea en una composición o en composiciones separadas, de forma simultánea o secuencial aplicados a la adhesión *in situ*. El uso de varios compuestos tiene la ventaja de que el autoantígeno que proporciona proteínas que tienen actividad de tirosinasa, se modificarán con varios compuestos y/o compuestos intermedios reactivos. De ese modo varios 'haptenos' diferentes en las enzimas tirosinasa proporcionarán a los sistemas inmunes de los sujetos tratados una gama más amplia de antígenos potenciales que pueden ser recogidos y presentados por moléculas de HLA. Dado que el 'ajuste' de un antígeno se encuentra entre otros factores altamente dependientes de isotipos de HLA, este enfoque ampliado estimulará la respuesta inmune potencial de forma significativa. El aumento de una reacción autoinmune sistémica contra todas las células que tienen actividad de tirosinasa proporciona también un medio excelente para combatir las metástasis distantes, incluso las micrometástasis, que no son accesibles a los métodos quirúrgicos o radioterapia y que no son accesibles para administración con fármacos tópicos. La capacidad de los melanomas para extenderse y formar metástasis locales y alejadas es un problema común en el tratamiento de pacientes que padecen melanomas malignos. Este problema se puede eliminar de forma eficaz con los métodos y medicamentos de la presente invención.

Las proteínas a modificar con los compuestos de monofenol o bencenodiol (= difenol) y por lo tanto que se van a convertir en una entidad capaz de inducir respuestas autoinmunes, son proteínas que son altamente específicas para células que tienen un metabolismo de melanina. Estas células comprenden principalmente normal melanocitos normales, células de nevus melanocítico o células de melanoma maligno. Las proteínas que se sabe que son específicas para melanocitos y células de melanoma y las proteínas que se sabe que están implicadas en el trastorno autoinmune vitiligo, y que pueden funcionar como autoantígenos, comprenden al menos tirosinasa (E.C.1.14.18.1), proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa (TRP1 y TRP2), pero también pueden comprender otras proteínas, que aún se tienen que identificar que también son capaces de presentar actividad de tirosinasa o actividad enzimática además corriente abajo en la ruta de la melanogénesis (Figura 2).

La invención, por lo tanto, desvela melanocitos y/o autoantígenos 'haptinizados' específicos de células de melanoma. La inducción de una respuesta inmune contra estos autoantígenos haptinizados de acuerdo con la invención se puede potenciar, acelerar, prolongar mediante el uso previo, simultáneo o posterior de compuestos inmunomodificables. Un objeto de la invención es provocar una respuesta de autoinmunidad contra estos antígenos, que se puede potenciar mediante compuestos capaces de activar o estimular respuestas inmunitarias, tales como diversos adyuvantes y modificadores inmunes conocidos en la técnica. En una realización, el uso de compuestos o composiciones que son capaces de recuperar linfocitos a la lesión tratada, activar células presentadoras de antígenos profesionales (células dendríticas tales como células de Langerhans), se puede combinar con el tratamiento y las composiciones de acuerdo con la invención. Por ejemplo los compuestos y/o adyuvantes que activan el receptor de tipo Toll (TLR) tales como LPS, lípido A, peptidoglicanos, flagelinas, ARNds, ARNss, ADN CpG, Pam3Cys o inmunomodificadores tales como imiquimod or resiquimod, ligandos CD40 o anticuerpos activantes se pueden aplicar por vía sistémica, pero preferentemente por vía tópica, para estimular una respuesta inflamatoria local en la lesión tratada de acuerdo con la invención. Los adyuvantes también se pueden usar de forma ventajosa en combinación con la invención. Además, se pueden aplicar compuestos tales como citoquinas (interleuquinas), quimioquinas e interferones que estimulan, potencian o prolongan una respuesta inmune contra los autoantígenos de la invención, modificados o 'haptinizados'. Esto se puede hacer proporcionándolos directamente o estimulando su síntesis o liberación local. En particular, el uso de interferón gamma e interleuquinas se puede usar para estimular la generación de una respuesta inmune celular y humoral contra los antígenos de la invención, en



particular mediante recuperación y activación de células presentadoras de antígenos profesionales.

En una realización particularmente referente de la invención, el método de tratamiento que comprende la sensibilización frente a tirosinasas haptinizadas por modificación química se combina con etapas para reducir o suprimir la función de linfocitos T reguladores. Los linfocitos T reguladores suprimen de forma activa la inducción de respuestas autoinmunes. La persona con experiencia puede elegir entre varios métodos y compuestos que son capaces de inhibir los linfocitos T reguladores (linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>). En particular el uso de fludarabina, ciclofosfamida y compuestos quimioterapéuticos relacionados son los medios preferentes para reducir el número y la actividad de linfocitos T reguladores y la ruptura de la tolerancia para los autoantígenos modificados de acuerdo con la presente invención. Con el fin de mejorar la activación de los linfocitos T durante la inmunización, se puede aplicar el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos de bloqueo (CTLA-4), bloqueo del (CTLA-4), un receptor crítico que regula de forma negativa la activación de los linfocitos T. El tratamiento previo con CTLA-4 antes con los antígenos haptinizados específicos de melanocitos de la invención es particularmente preferente.

Una composición farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la invención comprende al menos un compuesto de monofenol o bencenodiol de acuerdo con la invención que puede funcionar como un análogo de sustrato de tirosina y que es capaz de reaccionar con proteínas que presentan actividad de tirosinasa; proteínas de tirosinasa o proteínas 1 y 2 relacionadas con tirosinasa, que pueden ser activadas por estas enzimas en un compuesto intermedio reactivo que posteriormente puede reaccionar con tirosinasa u otras proteínas relacionadas. La composición comprende uno o más compuestos seleccionados entre compuestos modificadores del sistema inmune, adyuvantes inmunogénicos, y un compuesto capaz de inhibir los linfocitos T reguladores de la invención, y opcionalmente excipientes farmacéuticos. Los excipientes farmacéuticos pueden comprender cualquier excipiente conocido y habitual en la técnica y que se describe por ejemplo en Remington; The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>a</sup> Edición de 2005, University of Sciences en Philadelphia. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la invención pueden comprender aglutinantes tales como lactosa, celulosa y derivados de los mismos, polivinilpirrolidona (PVP), humectantes, promotores de disgregación, lubricantes, desintegrantes, almidón y derivados de los mismos, solubilizantes de azúcar, antioxidantes, conservantes, adyuvantes inmunoestimulantes u otros excipientes. La invención proporciona métodos y medios para formular y fabricar nuevos medicamentos y/o formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de melanomas mediante administración tópica para sensibilizar al sistema inmune contra antígenos de melanoma. La composición es preferentemente una composición que está optimizada para la administración trans-epidérmica, y puede comprender agentes penetrantes o permeadores y potenciadores de la penetración en la piel tales como disolventes orgánicos tales como DMSO, etanol o propilenglicol, por lo que el medio resultante (piel/disolvente) puede presentar un aumento del coeficiente de reparto para el o los compuestos terapéuticos. En otra realización, la composición es una denominada formulación de liberación lenta, que se conoce *per se* en la técnica de farmacia, y puede comprender, por ejemplo, un polímero, gel o matriz que controla la liberación, formando un depósito del compuesto o compuestos activos (es decir, los monofenoles y/o bencenodiolos), opcionalmente rodeados o revestidos con un revestimiento que controla la liberación o membrana o polímero biodegradable, proporcionando una administración lenta pero continua y/o liberación de los compuestos activos. Las composiciones de administración tópica comprenden ungüentos, pastas, geles, polvos medicinales, cremas, lociones, aerosoles, pulverizaciones, espumas y adhesivos medicados. Los adhesivos medicados, tales como depósitos en parches, permiten una administración sostenida del medicamento durante días en muchos casos a un ritmo constante. Como alternativa, la composición también puede comprender una formulación líquida farmacéuticamente aceptable que se puede inyectar directamente en la lesión.

La invención desvela proteínas y antígenos modificados o 'haptinizados'. Las proteínas haptinizadas de acuerdo con la divulgación, tirosinasa y proteínas 1 y 2 relacionadas con tirosinasa (TRP1 y TRP2), se pueden aislar a partir de fuentes *in vitro* o fuentes *in vivo*, es decir se pueden aislar a partir de expresión eucariota en células o a partir de tejidos (piel-), o a partir de expresión en células de microorganismos transgénicos. Las proteínas son de modificar *in vivo* y también *in vitro* poniéndolas en contacto con los compuestos de fenol y catecol descritos anteriormente, en condiciones que conducen a reacción con la tirosinasa o proteínas relacionadas, para proporcionar una fuente de proteínas haptinizadas. Estas proteínas haptinizadas, en particular enzimas tirosinasas y fragmentos de las mismas, serán útiles para la fabricación de composiciones de vacunación de melanoma y medicamentos. Los medicamentos de este tipo están dirigidos a estrategias de vacunación y son capaces de provocar respuestas inmunes contra estos autoantígenos haptinizados en un sujeto. Las proteínas haptinizadas o fragmentos de las mismas, se pueden incorporar en composiciones de vacuna, adecuadas para la administración a sujetos que padecen melanoma o en riesgo de desarrollar melanomas, en los que se debe generar una respuesta autoinmune contra los melanocitos y/o células de melanoma maligno.

La presente invención desvela linfocitos T y receptores de linfocitos T, que son específicos para los antígenos haptinizados de la invención. Estos linfocitos T y receptores de linfocitos T se pueden aislar a partir de sujetos tratados con los métodos y medicamentos de acuerdo con la presente invención. Los linfocitos T aislados se pueden propagar *in vitro*, opcionalmente inmortalizados, a través de técnicas de laboratorio convencionales. Los genes que codifican estos receptores de linfocitos T se pueden clonar a partir de estos linfocitos T a través de técnicas de AND recombinante convencionales conocidas en la técnica (Sambrook, Molecular Cloning, 3a edición, CSH press 2001, Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4a edición, 1999). Los receptores de linfocitos T clonados se pueden transferir fácilmente a linfocitos T autólogos a partir de cualquier sujeto a tratar para

melanomas u otras neoplasias que implican células con un metabolismo de melanina. Las técnicas de transferencia de linfocitos T están bien documentadas en la técnica. Los linfocitos T específicos para antígenos de melanoma obtenidos directamente a partir de sujetos tratados de acuerdo con la invención, u obtenidos después de transferencia del gen que codifica el receptor de linfocitos T, se puede usar para composiciones para tratar sujetos que padecen neoplasias que expresan tirosinasa, tales como (melanomas primarios) y/o metástasis de melanomas).

**Leyendas de las Figuras**

Figura 1. Monofenoles y bencenodiolos son estructuralmente similares a la tirosina, el sustrato para la tirosinasa que inicia la ruta bioquímica para la síntesis de melanina.

Figura 2. Esquema simplificado del metabolismo de la melanina.

**Ejemplos**

Ejemplo 1

*Formulación de crema y aplicaciones*

Monobenzona al 10-20 % en crema de base Lanette, que se aplicaba (una vez) diariamente; mediante aplicación tópica a la piel que cubre que rodea la lesión de melanoma durante 14 días consecutivos, seguido de extirpación o resección del tumor. La nueva aplicación de la crema para estimular la inmunidad se realizó cada 2 semanas.

Fluido de inyección: la Monobenzona al 1-5 % se disolvió en etanol y posteriormente se diluyó en agua. La composición se inyectó dentro del tumor o metástasis de melanoma o en un nevus melanocítico y se vuelve a aplicar cada 2 semanas durante 3 meses para estimular la respuesta.

Cualquier otro monofenol o bencenodiol (sustratos sustitutos) me metabolizado por la tirosinasa en una ortoquinona puede sustituir la Monobenzona como el principio activo. Para la formulación de sensibilización también se podría utilizar una mezcla de dos o más sustratos sustitutos. La concentración de los componentes activos puede variar de un 0,1 % a un 20 %.

La crema y el fluido de inyección (sustancias vehículo) formulados se pueden sustituir mediante cualquier otra sustancia vehículo y métodos de aplicación conocidos. La crema puede comprender por ejemplo una mezcla de agua, alcohol cetílico, propilenglicol, lauril sulfato sódico y cera.

La programación del tiempo el procedimiento de aplicación para inducir sensibilización contra melanoma o nevus melanocíticos la puede adaptar fácilmente el médico responsable del tratamiento de acuerdo con la respuesta y resultados clínicos, pero en general comprende preferentemente una administración diaria del compuesto activo durante al menos 1 semana, preferentemente de 2 a 8 semanas.

**Referencias**

1. Michael S. Sabel y Vernon K. Sondak. Tumor Vaccines: A Role in Preventing Recurrence in Melanoma? Am J Clin Dermatol 2002; 3: 609-616
2. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, et al., Cancer statistics 2001. CA Cancer J Clin 2001; 51: 15-36
3. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al., Final version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma. J Clin Oncol 2001; 19 (16): 3635-48
4. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, et al., Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. J Clin Oncol 1996; 14: 7-17
5. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sosman JA, et al., High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. J Clin Oncol 2001; 19: 2370-80
6. Leong SPL. Immunotherapy of malignant melanoma. Surg Clin North Am 1996; 76 (6): 1355-81
7. Wolchok JD, Livingston PO. Vaccines for melanoma: translating basic immunology into new therapies. Lancet Oncol 2001; 11: 205-11
8. Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. Curr Opin Immunol 2001; 13 (2): 134-40
9. Njoo MD, Westerhof W. Vitiligo: Pathogenesis and treatment. Am J Clin Dermatol 2001; 2: 167-181
10. Hann SK, Park YK, Lee KG, Choi EH, Im S. Epidermal changes in active vitiligo. J Dermatol 1992; 19: 217-222
11. Moellmann G, Klein-Angerer S, Scollay DA, Nordlund JJ, Lerner AB. Extracellular granular material and degeneration of keratinocytes in the normally pigmented epidermis of patients with vitiligo. J Invest Dermatol 1982; 97: 321-330
12. Le Poole IC, van den Wijngaard RMJGJ, Westerhof W, Dutrieux R, Das PK. Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation. J Invest Dermatol 1993; 100: 816-822

13. Le Poole IC, van den Wijngaard MJGJ, Westerhof W, Das PK. Presence of T cells and macrophages in inflammatory vitiligo skin parallels melanocyte disappearance. *Am J Pathol* 1996; 148: 1219-1228
14. Van den Wijngaard R, Wankowicz-Kalinska A, Le Poole C, Tigges B, Westerhof W, Das P. Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA+ T cells at the perilesional site. *Lab Invest* 2000; 80: 1299-1309
- 5 15. Van den Wijngaard R, Wankowicz-Kalinska A, Pals S, Weening J, Das P. Autoimmune melanocyte destruction in vitiligo. *Lab Invest* 2001; 81: 1061-1067
16. Wankowicz-Kalinska A, van den Wijngaard RM, Tigges BJ, Westerhof W, Ogg GS, Cerundolo V, Storkus WJ, Das PK. Immunopolarization of CD4+ and CD8+ T cells to Type-1-like is associated with melanocyte loss in human- vitiligo. *Lab Invest.* 2003; 83: 683-95.
- 10 17. Boissy RE, Manga P. On the Etiology of Contact/Occupational Vitiligo. *Pigment Cell Res.* 17: 208-214, 2004
18. Cummings MP, Nordlund JJ. Chemical leukoderma: fact or fancy. *Am J Contact Dermatitis* 1995; 6: 122-127
19. Ortonne J-P, Bose SK. Vitiligo: where do we stand? *Pigment Cell Res* 1993; 6: 61-72
- 15 20. Bleehen SS, Pathak MA, Hori Y, Fitzpatrick TB. Depigmentation of skin with 4-isopropylcatechol, mercaptoamines and other compounds. *J Invest Dermatol* 1968; 50: 103-117
21. Gellin GA, Maibach HI, Misiaszek MH. Detection of environmental depigmenting substances. *Contact Dermatitis* 1979; 5: 201- 213
22. Miyamoto L, Taylor JS, Chemical leukoderma. In: Hann S-K, Nordlund JJ, eds. *Vitiligo: A Comprehensive Monograph on Basic and Clinical Science.* Oxford: Blackwell Science Ltd; 2000. pp. 269-280
- 20 23. Riley PA. Melanogenesis: a realistic target for antimelanoma therapy? *Eur J Cancer* 1991; 27: 1172-1177
24. Riley PA. Melanogenesis and melanoma. *Pigment Cell Res.* 2003; 16: 548-552
25. Yang F, Sarangarajan R, Le Poole IC, Medrano EE, Boissy RE. The cytotoxicity and apoptosis induced by 4-tertiary butylphenol in human melanocytes are independent of tyrosinase activity. *J Invest Dermatol.* 2000 ; 114 (1): 157-64.
26. Riley PA. Mechanisms of inhibition of melanin pigmentation. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P, eds. *The Pigmentary System. Physiology and Pathophysiology.* New York: Oxford University Press; 1998. pp. 401-421
27. McGuire J, Hinders J. Biochemical basis for depigmentation of skin by phenol germicides. *J Invest Dermatol* 1971; 57: 256-261
- 30 28. Jimbow K, Obata H, Pathak MA, Fitzpatrick TB. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *J InvestDermatol* 1974; 62: 436-449
29. Thorneby-Andersson K, Sterner O, Hansson C. Tyrosinase-mediated formation of a reactive quinone from the depigmenting agents, 4-tert-butylphenol and 4-tert-butylcatechol. *Pigment Cell Res.* 2000; 13 (1): 33-8.
- 35 30. Lerner A.B., T.B. Fitzpatrick, E. Calkins, y WH. Summerson (1949) Mammalian tyrosinase: preparation and properties. *J. Biol. Chem.* 178: 185-195.
31. Lerch K. (1981) Copper monooxygenases: Tyrosinase and dopamine hydroxylase. En: *Metal Ions in Biological Systems.* H. Sigel, ed. New York. Marcel Dekker, Vol. 13, pp. 143-186.
32. Solomon, El. y M.D. Lowery (1993) Electronic structure contributions to function in bioorganic chemistry. *Science,* 259: 1575-1580.
- 40 33. Pomerantz, S.M. (1966) The tyrosine hydroxyase activity of mammalian tyrosinase. *J. Bioi. Chem.,* 241: 161-168.
34. Palumbo, A., M. d'Ischia, G. Misuraca, y G. Prota (1990) Activation of mammalian tyrosinase by ferrous ions. *Biophys. Biochim. Acta,* 1033: 256-260.
- 45 35. Menter J.M., M.E. Townsel, C.L. Moore, G.D. Williamson, B.J. Soteres M.S. Fisher, e I. Willis (1990) Melanin accelerates the tyrosinase-catalysed oxygenation of p-hydroxyanisole (MMEM). *Pigment Cell Res.,* 3: 90-97.
36. Osaki, S. (1963) The mechanism of tyrosine oxidation by mushroom tyrosinase. *Arch. Biochim. Biophys.,* 100: 378-384.
37. Kemp EH, Gawkrödger DJ, MacNeil S, Watson PF, Weetman AP. Detection of tyrosinase autoantibodies in patients with vitiligo using 35S-labeled recombinant human tyrosinase in a radioimmunoassay. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 69-73
- 50 38. Kemp EH, Waterman EA, Gawkrödger DJ, Watson PF, Weetman AP. Autoantibodies to tyrosinase-related protein-1 detected in the sera of vitiligo patients using a quantitative radiobinding assay. *Br J Dermatol* 1998; 139: 798-805
39. Kemp EH, Gawkrödger DJ, Watson PF, Weetman AP. Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 495-500
- 55 40. Kemp EH, Gawkrödger DJ, Watson PF, Weetman AP. Autoantibodies to human melanocyte-specific protein pmel17 in the sera of vitiligo patients: a sensitive and quantitative radioimmunoassay (RIA). *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 333-338
- 60 41. Xie Z, Chen D. Jiao D, Bystryjn J-C. Vitiligo antibodies are not directed to tyrosinase. *Arch Dermatol* 1999; 135: 417-422
42. Olivares C, Garcia-Borron JC, Solano F. Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase, Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* 2002, 41, 679-686.
- 65

## REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto de monofenol o bencenodiol seleccionado entre el grupo que consiste en fenol, catecol, hidroquinona, 4-terc-butilfenol, 4-terc-amilfenol, 4-terc-butilcatecol, éter monometílico de hidroquinona, éter monoetilico de hidroquinona, 4-terc-amilfenol, éter monobencílico de hidroquinona, 4-fenilfenol, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, 4-isopropilcatecol, 4-metilcatecol, p-cresol, 1,2-bencenodiol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, 4-S-cisteaminilfenol, o un sulfhidrilo seleccionado entre cisteamina, clorhidrato de  $\beta$ -mercaptoetilamina, clorhidrato de N-(2-mercaptoetil)-dimetilamina, ácido sulfanólico, clorhidrato de cistamina, y clorhidrato de 3-mercaptopropilamina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre una neoplasia que presenta actividad de enzima tirosinasa, una lesión pre-melanoma, un nevus melanocítico congénito (por ejemplo, nevus Velloso Gigante), un nevus melanocítico por ejemplo un nevus atípico o displásico, un nevus celular azul y nevus de Becker, en el que dicho compuesto de monofenol o bencenodiol se aplica por vía tópica, y en combinación con dicho uso, el uso de un compuesto adicional para la preparación de un medicamento en el tratamiento de dicha enfermedad, en el que dicho compuesto adicional se administra por vía sistémica o por vía tópica, siendo dicho compuesto adicional seleccionado entre el grupo que consiste en

- un compuesto modificador de la inmunidad seleccionado entre el grupo que consiste en imiquimod, resiquimod, interleuquinas, interferones, adyuvantes activadores de TLR, quimioquinas, ligandos CD40 o anticuerpos activantes,
- un adyuvante inmunogénico para estimular una respuesta inflamatoria local seleccionado entre el grupo que consiste en LPS, lípido A, peptidoglicanos, flagelinas, ARNs, ARNs, ADN CpG y Pam3Cys, y
- un compuesto capaz de inhibir linfocitos T reguladores seleccionado entre el grupo que consiste en fludarabina, ciclofosfamida y compuestos capaces de mejorar la activación de linfocitos T mediante bloqueo de CTLA4.

2. A compuesto de monofenol o bencenodiol seleccionado entre el grupo que consiste en fenol, catecol, hidroquinona, 4-terc-butilfenol, 4-terc-amilfenol, 4-terc-butilcatecol, éter monometílico de hidroquinona, éter monoetilico de hidroquinona, 4-terc-amilfenol, éter monobencílico de hidroquinona, 4-fenilfenol, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, 4-isopropilcatecol, 4-metilcatecol, p-cresol, 1,2-bencenodiol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, 4-S-cisteaminilfenol, o un sulfhidrilo seleccionado entre cisteamina, clorhidrato de  $\beta$ -mercaptoetilamina, clorhidrato de N-(2-mercaptoetil)-dimetilamina, ácido sulfanólico, clorhidrato de cistamina, y clorhidrato de 3-mercaptopropilamina para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre una neoplasia que presenta actividad de enzima tirosinasa, una lesión pre-melanoma, un nevus melanocítico congénito (por ejemplo, nevus Velloso Gigante), un nevus melanocítico por ejemplo un nevus atípico o displásico, un nevus celular azul y nevus de Becker, en el que dicho compuesto de monofenol o bencenodiol se aplica por vía tópica, y en combinación con dicho compuesto un compuesto adicional para uso en el tratamiento de dicha enfermedad, en el que dicho compuesto adicional se administra por vía sistémica o por vía tópica, siendo dicho compuesto adicional seleccionado entre el grupo que consiste en

- un compuesto modificador de la inmunidad seleccionado entre el grupo que consiste en imiquimod, resiquimod, interleuquinas, interferones, adyuvantes activadores de TLR, quimioquinas, ligandos CD40 o anticuerpos activantes,
- un adyuvante inmunogénico para estimular una respuesta inflamatoria local seleccionado entre el grupo que consiste en LPS, lípido A, peptidoglicanos, flagelinas, ARNs, ARNs, ADN CpG y Pam3Cys, y
- un compuesto capaz de inhibir linfocitos T reguladores seleccionado entre el grupo que consiste en fludarabina, ciclofosfamida y compuestos capaces de mejorar la activación de linfocitos T mediante bloqueo de CTLA4.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dos o más compuestos de monofenol o bencenodiol se combinan en el medicamento.

4. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en fenol, catecol, hidroquinona, 4-terc-butilfenol, 4-terc-amilfenol, 4-terc-butilcatecol, éter monometílico de hidroquinona, éter monoetilico de hidroquinona, 4-terc-amilfenol, éter monobencílico de hidroquinona, 4-fenilfenol, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, 4-isopropilcatecol, 4-metilcatecol, p-cresol, 1,2-bencenodiol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, 4-S-cisteaminilfenol, cisteamina, clorhidrato de  $\beta$ -mercaptoetilamina, clorhidrato de N-(2-mercaptoetil)-dimetilamina, ácido sulfanólico, clorhidrato de cistamina, y clorhidrato de 3-mercaptopropilamina, y que comprende adicionalmente uno o más seleccionados entre el grupo que consiste en

- un compuesto modificador de la inmunidad seleccionado entre el grupo que consiste en imiquimod, resiquimod, interleuquinas, interferones, adyuvantes activadores de TLR, quimioquinas, ligandos CD40 o anticuerpos activantes,
- un adyuvante inmunogénico para estimular una respuesta inflamatoria local seleccionado entre el grupo que consiste en LPS, lípido A, peptidoglicanos, flagelinas, ARNs, ARNs, ADN CpG y Pam3Cys, y
- un compuesto capaz de inhibir linfocitos T reguladores seleccionado entre el grupo que consiste en fludarabina, ciclofosfamida y compuestos capaces de mejorar la activación de linfocitos T mediante bloqueo de CTLA4

para uso en el tratamiento mediante administración tópica o mediante inyección directamente en la lesión de una neoplasia que presenta actividad de enzima tirosinasa, o una lesión pre-melanoma, un nevus melanocítico congénito (por ejemplo, nevus Velloso Gigante), un nevus melanocítico por ejemplo un nevus atípico o displásico, un nevus celular azul o nevus de Becker.

5 5. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la composición es adecuada para administración transdérmica y los excipientes comprenden al menos un potenciador de la penetración cutánea o un polímero, matriz, revestimiento o membrana para control de la liberación.

10 6. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la composición es adecuada para inyección directamente en la lesión.

15 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en las que el tratamiento es el tratamiento de una neoplasia que presenta actividad de enzima tirosinasa.

20 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en las que el tratamiento es el tratamiento de melanoma.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en las que el tratamiento es el tratamiento mediante administración tópica.

Fig 1

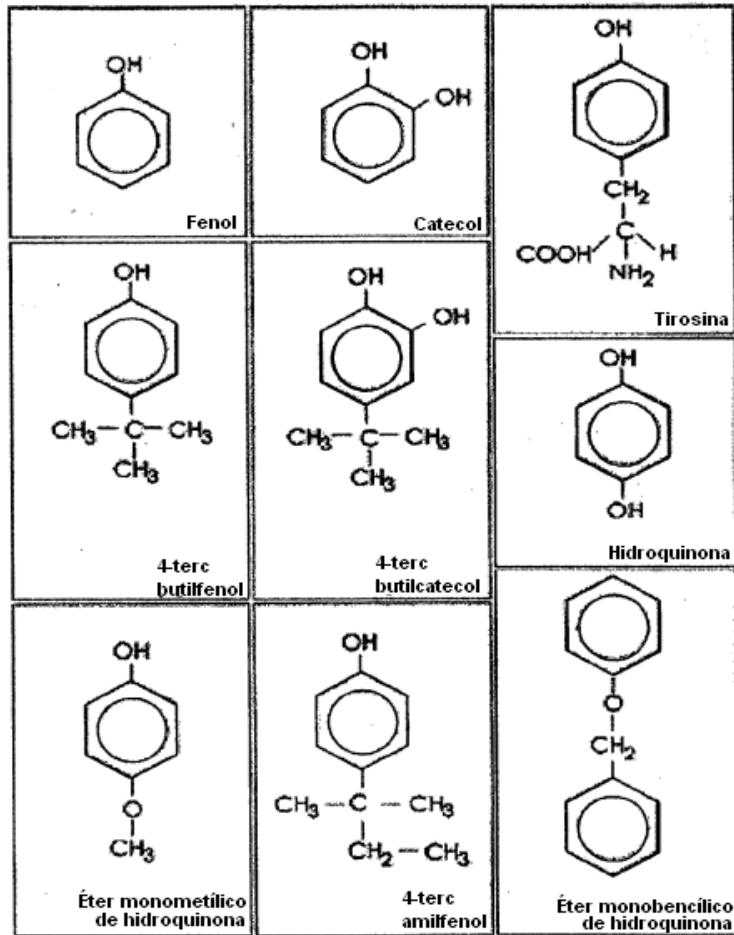


Fig 2

