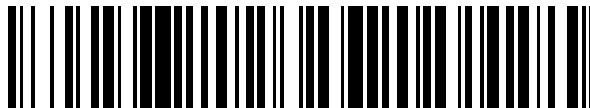


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 422**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 17/10 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2013 PCT/AU2013/000729**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14005183**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2013 E 13812528 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2869833**

54 Título: **Proteína C activada para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios de la piel**

30 Prioridad:

04.07.2012 AU 2012902874

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

19.07.2018

73 Titular/es:

**ZZ BIOTECH LLC (100.0%)
4203 Montrose Boulevard, Suite 450
Houston TX 77006, US**

72 Inventor/es:

**JACKSON, CHRISTOPHER JOHN y
XUE, MEILANG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 676 422 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

Proteína C activada para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios de la piel

- 5 Campo de la Invención
La invención se refiere a trastornos de la piel caracterizados por hiperproliferación de queratinocitos, que incluyen pero no se limitan a la psoriasis, y al tratamiento de los mismos.
- 10 Antecedentes de la Invención
La referencia a cualquier técnica anterior en la memoria descriptiva no es, y no se debe tomar como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en Australia o en cualquier otra jurisdicción o de que se podría esperar razonablemente que esta técnica anterior sea determinada, entendida y considerada relevante por los expertos en la materia.
- 15 La psoriasis, la enfermedad autoinmune más prominente, es de naturaleza tanto crónica como recurrente. Se caracteriza por alteración de la función barrera, hiperproliferación de queratinocitos epidérmicos e infiltración pronunciada de células inflamatorias.
- 20 Datos recientes han demostrado que aunque las células T inflamatorias son parte integral de la enfermedad, los queratinocitos son la causa principal de la inflamación patógena en la psoriasis, a través de la integración de las respuestas a la interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-17, interferón (INF)- γ , y TNF- α (1,2) y de la activación del factor nuclear NF- κ B, una molécula de señalización que mantiene la homeostasis inmune de los queratinocitos epidérmicos (3,4).
- 25 No hay cura para la psoriasis. Los medicamentos tópicos, la fototerapia, los agentes sistémicos tradicionales y los agentes biológicos sólo ofrecen opciones para el control de sus síntomas. A menudo se necesita una combinación de agentes para los casos moderados a severos y los resultados positivos a largo plazo requieren adherencia a la medicación (5).
- 30 Típicamente, la enfermedad localizada (10 % del área de la superficie corporal) se trata con medicamentos tópicos, mientras que áreas más grandes requieren fototerapia o terapia sistémica. La enfermedad localizada en las palmas de las manos y en las plantas de los pies a menudo se trata sistémicamente, ya que el grosor de la piel en esta zona no es susceptible a la terapia tópica.
- 35 Los agentes de tratamiento tópico incluyen corticosteroides tales como clobetasol y un análogo de vitamina D tal como calcitriol o calcipotrieno (6,7). El corticosteroide actúa disminuyendo la inflamación, suprimiendo la actividad mitótica y causando vasoconstricción en la zona objetivo. El mecanismo de acción de los análogos de la vitamina D no se comprende completamente, pero parece que regulan la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos (6). Por lo tanto, los componentes de ambos tratamientos incluyen la inhibición de la proliferación celular, aunque esto no es específico.
- 40 Los corticosteroides tópicos pueden causar atrofia, irritación y sequedad de la piel en la zona afectada. Los análogos de vitamina D son generalmente seguros pero pueden causar irritación, a la vez que existe un riesgo de hipercalcemia si se usan en dosis muy grandes (8).
- 45 Con una enfermedad psoriásica extensa, se utilizan fototerapia o tratamientos sistémicos. El tratamiento de primera línea para la psoriasis extensa es a través de la luz ultravioleta, tal como UVB y UVA. Sin embargo, este tratamiento se asocia con un mayor riesgo de quemaduras y de cáncer de piel, particularmente en pacientes con un color de piel más claro. También se puede usar metotrexato en dosis bajas si la terapia con luz UV resulta ineficaz. El metotrexato es razonablemente eficaz para controlar la psoriasis, pero está gravemente limitado por efectos tóxicos serios.
- 50 Gracias al conocimiento cada vez mayor de la naturaleza inmune de la enfermedad, se han utilizado satisfactoriamente en la psoriasis de moderada a grave, agentes biológicos que se dirigen a los linfocitos T, TNF- α , IL-12 e IL-23 (8). Tres inhibidores del TNF utilizados comúnmente incluyen Enbrel (etanercept), Humira (adalimumab) y Remicade (infliximab). Ustekinumab, un nuevo agente que se une a IL-12 e IL-23 fue aprobado para su comercialización en 2009, ofreciendo similares perfiles de eficacia y seguridad que los agentes anti-TNF (9).
- 55 Los agentes biológicos ofrecen considerables ventajas sobre las terapias sistémicas disponibles previamente, sin embargo, los ensayos clínicos de estos fármacos han demostrado que la actividad de tales compuestos va acompañada a largo plazo por una serie de desventajas (10-11). En primer lugar, en pacientes con infección latente por mycobacterium tuberculosis (TB), se puede desarrollar la infección TB activa poco después del inicio del tratamiento con infliximab. Además, los pacientes con inhibidores de TNF tienen un mayor riesgo de infecciones fúngicas oportunistas, tales como histoplasmosis pulmonar y diseminada, coccidioidomicosis y blastomicosis. En
- 60
- 65 segundo lugar, en algunos tratamientos tiene lugar un mayor riesgo dependiente de la dosis de tumores malignos

incluyendo linfoma y cáncer de piel. En tercer lugar, una proporción de pacientes no responde a los agentes o falla en el mantenimiento de la respuesta inicial. La disponibilidad del agente biológico también está limitada por su alto coste económico.

5 La proteína C activada (APC) induce la expresión génica de los genes humanos anti- apoptóticos bcl-2 y MIHB. Sobre la base de esta función antiapoptótica, la APC ha sido mencionada para la minimización de la apoptosis en una amplia serie de afecciones en las que la apoptosis está implicada, incluida una amplia serie de enfermedades inflamatorias específicas y no específicas de órganos, enfermedades autoinmunes, neoplasias y enfermedades infecciosas. Especialmente, no se aconseja el uso de APC para tratar todos los síntomas de la enfermedad en estas afecciones, sino simplemente para minimizar la apoptosis (véase el documento WO2001/072328).

10 Además, en este campo muchos son de la opinión de que los efectos antiapoptóticos, tales como los sugeridos en el documento WO2001/072328, deberían hacer que la APC no sea adecuada para el tratamiento de trastornos en los que existe una regulación disfuncional de la proliferación celular, especialmente trastornos que implican la hiperproliferación de los queratinocitos. En particular, es sabido que, aparte de la atenuación de la muerte celular inducida por calcio mediante la prevención de la apoptosis celular por APC, la APC también tiene un potente efecto estimulante sobre la proliferación de queratinocitos, y la APC promueve la supervivencia, crecimiento y migración de los queratinocitos de manera autocrina a través de EPCR (receptor de la proteína C endotelial), receptor del factor de crecimiento epidérmico y de la activación de las ERK1/2 (17, 20).

15 Existe la necesidad de nuevos enfoques y terapias para el tratamiento de, o para minimizar la evolución o los síntomas de, enfermedades o trastornos caracterizados por la hiperproliferación de queratinocitos, tales como la psoriasis.

25 Sumario de la Invención

La invención es como se define en las presentes reivindicaciones y busca abordar uno o más de los problemas o limitaciones anteriores, y en ciertas realizaciones proporciona un método para tratar a un individuo por un trastorno de la piel caracterizado por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos, que incluye:

30 disponer de un individuo que tiene una región de la piel caracterizada por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos;
poner en contacto la región de la piel con una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada (APC);
tratando de este modo el trastorno de la piel en el individuo.

35 En otras realizaciones, se proporciona un método para tratar la psoriasis en un individuo, que incluye:

40 disponer de un individuo que tiene una placa psoriásica;
aplicar una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada (APC) a la placa;
tratando de este modo la psoriasis en el individuo.

En otras realizaciones, se proporciona un método para tratar el acné en un individuo, que incluye:

45 disponer de un individuo que tiene acné;
aplicar una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada (APC) al acné;
tratando de este modo el acné en el individuo.

En otras realizaciones, se proporciona un método para tratar la dermatitis atópica en un individuo, que incluye:

50 disponer de un individuo que tiene dermatitis atópica;
aplicar una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada (APC) a la dermatitis atópica o a la región de la piel que la contiene;
tratando de este modo la dermatitis atópica en el individuo.

En otras realizaciones, se proporciona un método para tratar el pioderma gangrenoso en un individuo, que incluye:

55 disponer de un individuo que tiene pioderma gangrenoso;
60 aplicar una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada (APC) al pioderma gangrenoso o región de la piel que lo contiene;
tratando de este modo el pioderma gangrenoso en el individuo.

En otra realización, se proporciona un método para inducir la cicatrización de heridas o la regeneración tisular en una región de la piel que tiene un trastorno caracterizado por hiperproliferación de queratinocitos, que incluye:

65

disponer de un individuo que tiene una región de la piel con un trastorno caracterizado por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos;
poner en contacto la región de la piel con una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada (APC);
induciendo de este modo la cicatrización de la herida o la regeneración de tejido en la región de la piel.

5 En realizaciones adicionales se proporciona una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de APC para uso en la minimización de un trastorno de la piel caracterizado por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos, o para el tratamiento de la psoriasis, el acné o la dermatitis atópica, en un individuo.

10 En otras realizaciones más, se proporciona el uso de APC en la fabricación de un medicamento para minimizar un trastorno de la piel caracterizado por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos, o para el tratamiento de la psoriasis, el acné o la dermatitis atópica en un individuo.

15 En aún otras realizaciones, se proporciona el uso de APC para minimizar un trastorno de la piel caracterizado por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos, o para el tratamiento de la psoriasis, el acné o la dermatitis atópica en un individuo.

20 En otras realizaciones más, se proporciona un kit que incluye una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de APC e instrucciones escritas para el uso de APC en un método de tratamiento de un trastorno caracterizado por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos, o para el tratamiento de la psoriasis, el acné o la dermatitis atópica en un individuo, siendo el método como se describe en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1. (A) Se pretrataron queratinocitos de prepucio neonatal humano con APC durante 4 horas, después con TNF- α y se incubaron las células durante 72 horas y se detectó la proliferación mediante el ensayo de MTT. * P <0,05, ** P <0,01 en comparación con el control relevante. (B) Efecto de APC sobre el crecimiento de fibroblastos dérmicos de ratón (MDF) normales, fibroblastos dérmicos humanos (HDF) normales y fibroblastos sinoviales reumatoides (RSF, en rojo) humanos, medidos utilizando un ensayo de cristal violeta (media \pm SD. N = 4 experimentos separados. *, ‡, # P <0,01 en comparación con el control relevante, ANOVA. (C) Se trataron los RSF con APC durante 24 horas y se midieron las proteínas p21 y p27 por transferencia Western.

30 Figura 2: La APC exógena o endógena estimula la proliferación y previene la apoptosis de los queratinocitos cultivados. A) Se midió la proliferación utilizando un ensayo de MTT y los datos se expresaron como % de proliferación celular en comparación con el control. B) Proliferación de queratinocitos en respuesta a PC con siRNA y tratamiento con APC después de 72 h como se detectó por el ensayo de MTT. La proliferación celular se expresa como un porcentaje del control. C y D) Se trataron los queratinocitos con PC siRNA (0,5 μ m). Después de 48 h, se usaron las células para un ensayo de TUNEL (terminal dUTP nick-end labeling) para detectar células apoptóticas (las flechas negras indican células apoptóticas) (C) y se cuantificaron contando las células apoptóticas bajo un microscopio de alta potencia (x20) (D) Los datos se expresaron como el número medio de células apoptóticas por campo de 15 campos (media \pm S.E., n = 3). Los gráficos representan uno de tres experimentos independientes. Las imágenes representan uno de tres experimentos independientes. * p <0,05, ** p <0,01. Barra de escala: 40 μ m.

35 Figura 3: El tratamiento con PC siRNA o EPCR siRNA inhibe el crecimiento y promueve la apoptosis de células HUVEC. A) Tasa de proliferación de células HUVEC en respuesta al control, tratamiento con PC siRNA o EPCR siRNA (500 nM) en presencia o ausencia de APC o PC exógena, como se detecta por el ensayo de MTT. La proliferación celular se expresa como un porcentaje del control (media \pm SD) durante 72 h. ** P <0,01 en comparación con el control (1ª barra), ## P <0,01 en comparación con PC siRNA (2ª barra). B) Proliferación de células HUVEC en respuesta a un anticuerpo bloqueante para EPCR (RCR252) en presencia o ausencia de APC recombinante. La proliferación celular se expresa como un porcentaje del control (media \pm SD) durante 72 h. *P <0,05 en comparación con el control (1ª barra), #P <0,05 en comparación con APC sola (5ª barra). C-E) Se trataron las células HUVEC con control, PC siRNA o EPCR siRNA (ambos a 500 nM). Después de 36 h, las células transfectadas se trataron con APC recombinante (1 μ g/ml) durante 12 h, y se recogieron las células a las 48 h. Se detectó la caspasa-3 activa mediante tinción inmunofluorescente (las flechas blancas indican células positivas para caspasa-3 activa) (C) y se detectaron las células apoptóticas mediante el kit de detección de muerte celular *in situ* (las flechas blancas indican células apoptóticas) (D). Las imágenes representan uno de tres experimentos independientes. Barra de escala 40 μ m. E) Las células apoptóticas (procedentes de D) se cuantificaron contando las células co-teñidas con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) bajo el microscopio. Los datos se expresan como el número medio de células apoptóticas con un gran aumento (40x) (media \pm SEM n = 3). *P <0,05, **P <0,01 en comparación con el control (1ª barra), #P <0,05 en comparación con el tratamiento con PC siRNA (2ª barra)

Descripción detallada de las realizaciones

65 Como se ha mencionado previamente, en el momento de la invención, se entendió que los queratinocitos estaban implicados críticamente en la patología de una serie de trastornos inflamatorios de la piel incluyendo la psoriasis. Se entendió que muchas de las terapias antiinflamatorias de larga duración minimizaban beneficiosamente la

replicación de las células inflamatorias, y puesto que es preferible la inhibición del crecimiento y/o de la replicación de las células inflamatorias, aquellos compuestos que se había previsto que eran antiapoptóticos no se consideraron para uso clínico en el tratamiento de estas enfermedades. Estas son algunas de las razones por las cuales, a pesar de su función antiinflamatoria, antes de esta invención, nunca se había sugerido que la APC minimizara o resolviera los trastornos de la piel caracterizados por una proliferación hiperproliferativa, hiperplásica o desregulada de otro modo, de los queratinocitos. De hecho, antes de la invención, se vio que los datos publicados acerca del efecto estimulante de la APC sobre la proliferación de los queratinocitos implican que la terapia con APC sería perjudicial para las enfermedades inflamatorias de la piel tales como psoriasis, acné y otros trastornos de la piel caracterizados por hiperproliferación de queratinocitos.

Como se describe en la presente memoria, el inventor ha encontrado sorprendentemente que la APC inhibe la apoptosis en los queratinocitos o células humanas de crecimiento lento o normales, pero tiene el efecto de inhibir la proliferación de los queratinocitos o células anormales o de crecimiento rápido, siendo estos últimos los mediadores de una amplia serie de trastornos inflamatorios de la piel.

A partir de esto, el inventor ha reconocido que en los trastornos de la piel asociados con la hiperproliferación de queratinocitos, existen dos poblaciones de queratinocitos con respecto a la respuesta a señales mediadas por la APC antiapoptótica. Específicamente, aquellos que responden a la APC (es decir, que no experimentan apoptosis en respuesta a los niveles basales de APC) son células no inflamatorias de crecimiento lento, normales. Además, aquellos que responden a la APC (es decir, que experimentan apoptosis en respuesta a los niveles basales de APC) son células inflamatorias de crecimiento más rápido, anormales.

Es importante destacar que el inventor ha descubierto que, aunque la APC puede estimular la proliferación de células normales de crecimiento más lento, tiene una capacidad selectiva única para inhibir la proliferación de las células de crecimiento rápido. En la presente memoria se muestran datos en los que la APC potencia la proliferación e inhibe la apoptosis de células humanas de crecimiento lento o normales en condiciones basales, incluyendo las células endoteliales y los queratinocitos. Sin embargo, según la invención, la APC regula de forma diferente la proliferación celular dependiendo del estado inflamatorio de las células, específicamente la APC inhibe el crecimiento de los queratinocitos estimulados por TNF- α y de los fibroblastos sinoviales de crecimiento rápido procedentes de la artritis reumatoide sinovial.

Del trabajo descrito en la presente memoria, el inventor ha concebido que, contrariamente a lo que se entiende de las publicaciones anteriores a la invención, los beneficios antiinflamatorios de la APC podrían aplicarse a pacientes que requieren tratamiento de trastornos de la piel caracterizados por hiperproliferación de queratinocitos, porque mientras que el efecto anti-inflamatorio se aplicaría a las células inflamatorias, el efecto anti-apoptótico se aplicaría selectiva o específicamente a los queratinocitos que no son inflamatorios, y no a los queratinocitos inflamatorios.

Además, el resultado de tal tratamiento debería ser la proliferación normal continuada de queratinocitos no inflamatorios (que se derivan de la función antiapoptótica de APC) y a través de la administración de APC, la provisión de condiciones que incluyen antiinflamación, junto con la posibilidad de permitir que los queratinocitos inflamatorios, hiperproliferativos se vuelvan apoptóticos.

A. Definiciones

Como se usa en la presente memoria, excepto cuando el contexto requiera otra cosa, el término "comprender" y las variaciones del término, tales como "que comprende", "comprende" y "comprendido", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

"Queratinocito" generalmente se refiere a una célula epidérmica que sintetiza queratina y otras proteínas y esteroides. Estas células constituyen el 95 % de la epidermis, siendo formadas a partir de células indiferenciadas o basales en la unión dérmica-epidérmica. Su proteína de filamento característica intermedia es la citoqueratina. En sus diferentes etapas sucesivas, la queratina forma la capa de células espinosas y la capa de células granulares, en la cual las células se aplanan y mueren lentamente para formar la capa final, el estrato córneo, que se exfolia gradualmente.

"Hiperproliferación" generalmente se refiere a una tasa anormalmente alta de proliferación celular por división rápida. La hiperproliferación en algunos contextos puede surgir de una célula que existe en gran medida en las fases G₁, S o G₂ del ciclo celular. La hiperproliferación se puede denominar también hiperplasia, y las células hiperproliferativas se pueden denominar células o tejido hiperplásico.

"Queratinocitos hiperproliferativos" son generalmente queratinocitos que tienden a existir en una etapa de interfase del ciclo celular, tal como G₁, S o G₂. Estas células se diferencian de los queratinocitos normales en que los queratinocitos normales generalmente existen en G₀ (Gap cero), que es una etapa separada de la interfase o una fase G₁ extendida, que sigue el punto de restricción, un punto de control del ciclo celular encontrado al final de G₁. Los queratinocitos hiperproliferativos se caracterizan también generalmente por tener una expresión de genes inflamatorios y, en particular, genes implicados en la ruta de señalización NF- κ B.

Los "queratinocitos normales" generalmente son queratinocitos que tienden a existir en G₀ o en una fase G₁ extendida. Generalmente, estos queratinocitos son típicamente de los que no han sido estimulados con TNF- α , y generalmente no tienen expresión de genes de la ruta de señalización de NF- κ B.

5 "Proteína C activada" o "APC" generalmente se refiere a una serina proteasa que funciona como un anticoagulante mediante unión a la proteína S y la inactivación proteolítica de los factores Va y VIIIa y la estimulación de la fibrinólisis a través de la neutralización de un inhibidor del activador del plasminógeno. Walker *et al.*, FASEB J. 6, 2561 - 2567 (1992); Esmon, Arterioscler. Thromb. 12, 135 - 145 (1992); van Hinsbergh *et al.*, Blood 65, 444 - 451 (1985). La proteína C precursora se produce principalmente en el hígado. La activación se logra por la eliminación
10 de un dodecapéptido en el N terminal de la cadena pesada de proteína C. La ruta de la proteína C se inicia cuando la trombina se une a la proteína de la superficie celular endotelial, trombomodulina y la proteína C se une al receptor de la proteína C de la célula endotelial. Al inactivar los factores Va y VIIIa, la APC limita la cantidad de trombina formada. Esmon, Arterioscler. Thromb. 12, 135 - 145 (1992).

15 "Tratar" y "tratamiento" generalmente se refieren al control y cuidado de un paciente con el propósito de combatir una enfermedad, afección o trastorno ya sea para eliminar la enfermedad, afección o trastorno, o profilácticamente para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones de la enfermedad, afección patológica o trastorno.

20 Un "trastorno de la piel caracterizado por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos" se refiere generalmente a una enfermedad, afección, síndrome o similar en el que predominan los queratinocitos hiperproliferativos, y en particular hay una abundancia de queratinocitos hiperproliferativos en comparación con el tejido normal. El trastorno puede ser un trastorno inflamatorio, y que típicamente implica uno o más de los estratos basal (estrato germinativo), estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo. Los ejemplos de trastornos de la piel incluyen psoriasis pustulosa (supurativa) y no pustulosa (no supurativa), que incluye las formas descritas en la presente
25 memoria, y acné que incluye acné vulgar o acné quístico.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" generalmente se refiere a una cantidad de compuesto farmacéutico que proporciona el resultado clínico deseado. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de APC generalmente proporciona un efecto antiapoptótico sobre los queratinocitos normales y puede proporcionar o no un
30 efecto apoptótico sobre los queratinocitos hiperproliferativos. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de APC puede detener la proliferación de los queratinocitos hiperproliferativos y/o proporcionar un efecto antiinflamatorio. Las cantidades relevantes se pueden establecer o determinar según los métodos de la invención descritos en la presente memoria.

35 Una "cantidad inductora de la apoptosis" generalmente se refiere a una cantidad de APC que proporciona la inducción de la apoptosis de un queratinocito hiperproliferativo.

Una "cantidad estimuladora del crecimiento" generalmente se refiere a una cantidad de APC que proporciona la inducción de la proliferación de queratinocitos no hiperproliferativos, y en particular, de queratinocitos no
40 inflamatorios normales, de crecimiento lento.

Una cantidad "antiinflamatoria" generalmente se refiere a una cantidad de APC que proporciona la minimización de la inflamación de un trastorno de la piel caracterizado por queratinocitos hiperproliferativos.

45 B. Métodos de tratamiento

Entendiendo que la APC no evita que los queratinocitos hiperproliferativos inflamatorios experimenten apoptosis, el inventor ha reconocido que se puede usar la APC para proporcionar efectos antiinflamatorios para trastornos como la psoriasis y el acné sin agravar o empeorar estas afecciones como ocurriría de otra manera si se impidiera la
50 apoptosis en los queratinocitos inflamatorios o se indujera de otra forma que proliferaran o crecieran, como se pensaba previamente antes de esta invención. Por lo tanto, en ciertas realizaciones se proporciona un método para tratar a un individuo de un trastorno de la piel caracterizado por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos. El método incluye:

55 disponer de un individuo que tiene una región de la piel caracterizada por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos;
poner en contacto la región de la piel con una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada (APC);
tratando de este modo el trastorno de la piel en el individuo.

Según el método, la APC se administra directamente al sitio o región de la piel caracterizada por la presencia de
60 queratinocitos hiperproliferativos poniendo en contacto la APC o la formulación que la contiene con la región relevante. El sitio o región puede ser una herida abierta o una superficie de la piel rota como ocurre en el acné o en la psoriasis pustulosa, o puede no estar sustancialmente rota, es decir, puede ser más como una placa u otro tejido elevado, endurecido o fibrótico. Cuando el sitio o región está abierto en el sentido de estar roto o similar, se puede aplicar la APC a la superficie que rodea la ruptura y/o al tejido expuesto que normalmente subyace a la superficie de
65 la piel (por ejemplo, estrato basal (estrato germinativo), estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido).

5 En este contexto, un hallazgo importante del inventor ha sido que se puede administrar la APC en el sitio requerido
donde la piel está sustancialmente intacta, por ejemplo en una región que rodea una pústula de ruptura, o en una
superficie de la piel que esté de otro modo sustancialmente sin ruptura. Esto hace posible la administración local por
contacto directo de la APC o una formulación relevante con el sitio, algo que es bastante distinto de las aplicaciones
sistémicas clínicas previas de APC en el tratamiento de una enfermedad o afección diseminada, tal como la
septicemia. La administración local de APC según la invención es ventajosa y aplicable a enfermedades que son
locales en lugar de diseminadas o sistémicas ya que limita el riesgo asociado con la administración de APC a la
región local y minimiza sustancialmente los riesgos asociados con la administración sistémica de APC. por ejemplo,
10 por perfusión continua.

15 La administración local de APC al sitio de interés es una desviación significativa de la administración de APC
conocida en la técnica para el tratamiento de otras enfermedades y afecciones. Según los métodos conocidos en la
técnica en el momento de esta invención, la APC se administra preferiblemente por vía parenteral, más
preferiblemente por vía intravenosa, a una dosis de aproximadamente 1 µg/día a aproximadamente 500 mg/día o de
aproximadamente 1 UI/kg/día a aproximadamente 6000 UI/kg/día para un paciente humano. Véanse, por ejemplo,
las patentes de los Estados Unidos números 5.151.268 y 5.571.786. Para la septicemia grave, se administra Xigris™
por perfusión continua a una tasa desde aproximadamente 12 µg/kg/h hasta aproximadamente 30 µg/kg/h para dar
una concentración plasmática en estado estacionario de aproximadamente 45 ng/ml de APC después de
20 aproximadamente dos horas de perfusión. La presente invención generalmente no se basa en una perfusión
continua por administración sistémica. Por el contrario, se basa en una administración local de APC poniendo en
contacto la región de la piel con una cantidad terapéuticamente eficaz de APC como se describe en la presente
memoria.

25 La región de la piel que se pone en contacto con la cantidad terapéuticamente eficaz de APC puede estar inflamada
o la inflamación puede estar en recesión. En una realización, el trastorno de la piel se caracteriza por uno o más, o
todos los procesos siguientes: apoptosis, inflamación, función de barrera deteriorada.

30 En una realización, la región de la piel está inflamada. Un ejemplo particularmente importante es una región de la
piel asociada con la inflamación crónica. Esta piel puede tener la apariencia de una placa psoriásica y manifestarse
en asociación con pústulas, aunque la placa puede ser sustancialmente no pustulosa.

35 El trastorno de la piel se puede seleccionar del grupo que consiste en psoriasis, dermatitis herpetiforme, y acné
vulgar o acné quístico.

El trastorno de la piel puede ser psoriasis no pustulosa, por ejemplo, psoriasis vulgar o psoriasis eritrodérmica.

40 El trastorno de la piel puede ser psoriasis pustulosa, por ejemplo, psoriasis pustulosa generalizada, pustolosis
palmaris et plantaris, psoriasis pustulosa anular, acrodermatitis continua o impétigo herpetiforme.

Típicamente, cuando la afección es la psoriasis, la región de la piel que se pone en contacto con la APC es una
placa psoriásica. Por lo tanto, en otra realización, se proporciona un método para tratar a un individuo por psoriasis.
El método incluye:

45 disponer de un individuo que tiene una placa psoriásica;
 aplicar una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada (APC) a la
 placa;
 tratando de este modo la psoriasis del individuo.

50 Cuando la afección es acné vulgar, la región de la piel que se pone en contacto con la APC puede incluir piel con
ruptura y piel sin ruptura. Por lo tanto, en otra realización, se proporciona un método para tratar a un individuo por
acné. El método incluye:

55 disponer de un individuo que tiene acné;
 aplicar una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada (APC) al
 acné;
 tratando de este modo el acné en el individuo.

60 Cuando la afección es una dermatitis atópica, la región de la piel en contacto con APC puede incluir piel con ruptura
y piel sin ruptura. Por lo tanto, en otra realización, se proporciona un método para tratar a un individuo por dermatitis
atópica. El método incluye:

65 disponer de un individuo que tiene dermatitis atópica;
 aplicar una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada (APC) a la
 dermatitis atópica;

tratando de este modo la dermatitis atópica en el individuo.

La dermatitis atópica puede ser una forma de eczema seleccionada del grupo que consiste en eczema endógeno, eczema flexural, eczema infantil, y también puede ser conocida como "prurigo Besnier", "neurodermitis" o "prurigo diatésico".

A pesar de lo anterior, los expertos en la técnica entienden que la dosis de APC, proteína C, agente que aumenta la síntesis de proteína C y/o activador de proteína C variará con el compuesto particular o combinación de compuestos empleados, la enfermedad o afección a ser tratada, la gravedad de la enfermedad o afección, el tipo o tipos de administración local, la velocidad de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, la identidad de cualquier otro fármaco administrado al animal, la edad, tamaño y especie del animal, y factores similares conocidos en las artes médicas. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto o combinación de compuestos será aquella cantidad que sea la dosis eficaz más baja que produzca un efecto terapéutico. La cantidad de dosis, la forma farmacéutica y el modo de administración serán determinados por el médico responsable dentro del alcance de un criterio médico razonable. Las dosis, formas farmacéuticas y modos de administración eficaces para los diferentes compuestos y combinaciones de compuestos se pueden determinar empíricamente y el hacer tales determinaciones está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, es importante que la APC se proporcione de modo que sea posible poner en contacto la APC con los queratinocitos de la piel, ya que, aunque no se quiere limitar por hipótesis, se cree que es gracias a este contacto por lo que la APC proporciona actividad antiapoptótica selectiva (es decir, selectiva para las células no inflamatorias no hiperproliferativas) de la invención, y actividad antiinflamatoria. Generalmente, las células que han sido puestas en contacto con APC se pueden reconocer por tener las siguientes características, niveles más altos de metaloproteinasa de matriz activada (MMP)-2 y receptor de proteína C endotelial (EPCR) y actividad más baja de MAP quinasa ERK activada, y de este modo, el contacto de las células con APC, y por lo tanto, la eficacia terapéutica del tratamiento se puede establecer mediante la evaluación de estos fenotipos celulares.

En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de APC generalmente proporciona un efecto antiapoptótico sobre los queratinocitos normales y un efecto apoptótico sobre los queratinocitos hiperproliferativos. Este resultado se puede evaluar de la siguiente manera: medida del ensayo de supervivencia/proliferación celular (MTT) y de apoptosis celular (ensayo de TUNEL), estableciendo de este modo si se ha proporcionado o no una cantidad terapéuticamente eficaz de APC. Un método ejemplar se muestra adicionalmente en la presente memoria.

En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de APC puede parar la proliferación de queratinocitos hiperproliferativos y/o proporcionar un efecto antiinflamatorio. Este resultado se puede evaluar de la siguiente manera:

- medida de la viabilidad/proliferación celular (ensayo MTT);
- ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para las citocinas inflamatorias - IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-21/23 o TNF- α o
- ensayo ELISA para EPCR (R & D Systems, Inc., MN);
- análisis FACS con yoduro de propidio (PI) o PI más anexina para la apoptosis;
- transferencia Western para detectar las moléculas de señalización inflamatorias tales como NF- κ B;

estableciendo de este modo si se ha proporcionado una cantidad terapéuticamente eficaz de APC.

En otra realización, los resultados anteriores se obtienen estableciendo una concentración de tejido local de APC en la región de la piel de 1 μ g a 100 mg de APC por g de tejido de piel. Esto se puede determinar tomando biopsias por punción de la piel bajo anestesia local de la misma placa crónica. La cantidad de APC se puede determinar entonces por métodos conocidos en la técnica. En un ejemplo, los tejidos de biopsia se trituran y se lisan en hielo. Después de la centrifugación, los sobrenadantes transparentes se usan para medir la concentración de PC por ELISA y la actividad de APC por el ensayo de sustrato cromogénico Spectrozyme PCa (American Diagnostica). La actividad enzimática se determina midiendo el aumento en la absorbancia del cromóforo libre generado por unidad de tiempo a λ 450 nm.

En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de APC es de 0,1 μ g a 5000 μ g de APC por cm^2 de la región de la piel a la que se aplica la APC, o de 1 μ g a 2000 μ g de APC por cm^2 de la región de la piel a la que se aplica la APC, o de 10 μ g a 1000 μ g de APC por cm^2 de la región de la piel a la que se aplica la APC, o de 10 μ g a 200 μ g, o de 10 μ g a 400 μ g, o de 10 μ g a 800 μ g de APC por cm^2 de la región de la piel a la que se aplica la APC.

La APC se puede administrar una vez por semana hasta dos veces al día, dependiendo de la naturaleza de la afección. Por lo general, se proporciona durante no más de 20 semanas de días consecutivos, o de no más de 6 semanas de días consecutivos.

B.1 Métodos de tratamiento tópico

Los métodos de tratamiento tópico, por ejemplo, utilizando una pasta, gel, crema, aceite, loción, espuma, pomada o sustancia similar son particularmente útiles cuando la región relevante de la piel es una que contiene una superficie de la piel rota, ya que esto permite la penetración de la APC a los estratos relevantes del tejido de la piel donde residen los queratinocitos inflamatorios. Sin embargo, estos tratamientos también se pueden aplicar cuando la superficie de la piel está sustancialmente sin romper, por ejemplo, a una placa psoriásica.

En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de APC puede ser de 0,1 a 2000 µg, preferiblemente de 20 a 200 µg de APC por cm² de la región de la piel. En general, es preferible una cantidad mayor cuando la piel está más severamente afectada, y generalmente es preferible con psoriasis crónica grave de tipo placa [Índice de gravedad y área de la psoriasis (PASI) mayor que o igual a 12, superficie corporal (BSA) mayor que o igual a 10] donde están presentes lesiones con úlcera, en las cuales la APC puede promover la cicatrización de la úlcera. Pueden ser preferibles cantidades más bajas cuando la piel no está severamente afectada, por ejemplo, cuando están presentes lesiones sin úlcera.

La concentración de APC en la formulación puede estar entre aproximadamente 10 µg/ml y 1 mg/ml y el volumen de composición aplicado a la región de la piel es de aproximadamente 100 µl a 10 ml.

Generalmente, cuando la afección relevante es la psoriasis, la composición se proporciona a la piel generalmente con una superficie estéril, tal como un dedo o una espátula en una capa de no más de aproximadamente 10 mm de espesor, preferiblemente de aproximadamente 3 mm de espesor. Después puede ser frotada o masajeadá sobre la región de la piel y el área circundante. La aplicación generalmente es de una vez al día a una vez a la semana, y generalmente durante no más de 20 semanas, o no más de 12 semanas.

Un procedimiento de aplicación y un régimen de dosificación similares se pueden aplicar al tratamiento del acné o de la dermatitis atópica.

En una realización, la composición que contiene APC se puede aplicar a un sustrato sólido, es decir, un vendaje, apósito o similar, y el sustrato se fija después a la región relevante de la piel.

B.2 Métodos de tratamiento - inyección intradérmica

En ciertas realizaciones, los resultados anteriores se obtienen estableciendo una concentración local de APC al menos 2 veces más alta que la línea base. Esta cantidad de APC se puede medir midiendo la actividad de APC de la biopsia de piel utilizando ELISA y el ensayo de sustrato cromogénico Spectrozyme PCa como se ha mencionado antes. La inyección intradérmica o subcutánea generalmente es preferible como vía de administración cuando el estrato córneo está intacto y es de tal naturaleza que hay una penetración limitada de APC a través de la capa tóptica de la piel. En general, se puede utilizar una aguja de calibre fino (~28-34 G) en una jeringa de 1 ml. Se pueden administrar inyecciones múltiples para cubrir el área superficial de la piel, con ~ 1 inyección por cm². La cantidad por inyección variará de 10 µl a 1 ml, siendo la cantidad típica de 50 µl. En general, la administración se da de una vez al día a una vez a la semana, y generalmente no más de 20 semanas. La inyección intradérmica o subcutánea se pueden usar concurrentemente con la aplicación tóptica de APC. La indicación preferida es psoriasis o dermatitis atópica, aunque otras afecciones caracterizadas por hiperproliferación de queratinocitos pueden ser sometidas a este tratamiento.

Una realización ejemplar de la administración subcutánea/intradérmica puede ser útil en la psoriasis crónica grave de tipo placas [Índice de gravedad y área de la psoriasis (PASI) ≥ 12, área de superficie corporal (BSA) ≥ 10] donde las lesiones están presentes con o sin úlceras. La APC se administra por vía subcutánea a una dosis de 200-2000 µg, dependiendo del tamaño de la placa o lesión, dos veces por semana durante 12 semanas, seguido de un período de seguimiento de 4 semanas. La inyección se realiza con una aguja de calibre 30 con un volumen total de 500 µl a 5 ml, preferiblemente de 1 ml. La APC se inyecta múltiples veces (intradérmicamente o subcutáneamente) en sitios equiespaciados que rodean la lesión - si la lesión era <10 cm², hay 4 sitios y el número de sitios y la dosis aumentan proporcionalmente con el aumento del tamaño de la lesión. La APC se disuelve en agua para formar una solución salina isotónica tamponada. Si es necesario, este tratamiento se puede combinar con un tratamiento tópico. La APC en líquido se puede aplicar sobre las lesiones, diariamente, continuando durante el mismo período de tratamiento subcutáneo. En ambos estudios (con o sin tratamiento tópico) se pueden analizar el PASI, la evaluación global estática del médico (sPGA), el Índice de calidad de vida en dermatología (DLQI), los efectos adversos y los valores hematológicos y de laboratorio rutinarios (por ejemplo, citoquina, examen histológico, actividad de PC/APC). Resultados esperados: En la semana 12, se espera una mejoría > 30 % en el PASI en todos los pacientes y una mejoría > 60 % en el PASI en el 50 % de los pacientes.

En una realización, un método descrito anteriormente incluye la etapa de poner en contacto la región de la piel con una cantidad antiinflamatoria de APC.

En una realización, un método descrito anteriormente incluye la etapa de poner en contacto la región de la piel con una cantidad de APC estimuladora del crecimiento.

En una realización, un método descrito anteriormente incluye la etapa de poner en contacto la región de la piel con una cantidad de APC que induce la apoptosis.

5 C. APC y sus formulaciones

La APC para su uso en un método descrito anteriormente puede tomar la forma de una composición, o se puede obtener de otra manera mediante un procedimiento, como se describe a continuación.

10 La APC se puede preparar por activación *in vitro* de la proteína C purificada a partir de plasma o preparada mediante técnicas de DNA recombinante por métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 4.981.952, 5.151.268, 5.831.025, 6.156.734, 6.268.344 y 6.395.270.

15 Alternativamente, se puede preparar la APC directamente mediante técnicas de DNA recombinante. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 4.981.952, 5.151.268, 6.156.734, 6.268.344 y 6.395.270. La proteína C activada recombinante se puede producir activando el zimógeno de proteína C recombinante humana *in vitro* o por secreción directa de células de la forma activada de proteína C. La proteína C se puede producir en animales transgénicos, plantas transgénicas o una variedad de células eucariotas, incluyendo, por ejemplo, la secreción de células 293 de riñón humano como un zimógeno, después se purifica y se activa mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

20 La APC puede ser de cualquier especie animal, pero se prefiere la APC humana.

25 Los fragmentos y derivados de APC se pueden usar en la práctica de la invención, siempre que muestren las actividades descritas en esta memoria. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.151.268, 5.453.373 y 5.516.650 y las solicitudes PCT WO 89/12685, WO 01/56532, WO 01/59084 y WO 01/72328.

30 La APC puede ser un derivado de APC humana que tiene actividades proteolíticas, amidolíticas, esterolíticas y biológicas (anticoagulantes, antiinflamatorias o pro-fibrinolíticas) características de la APC humana. Los ejemplos de derivados de proteína C están descritos por Gerlitz, *et al.*, Patente de Estados Unidos número 5.453.373, y Foster, *et al.*, Patente de Estados Unidos número 5.516.650.

35 Las composiciones farmacéuticas adecuadas de APC comprenden la APC y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 6.395.270 y 6.159.468 y las solicitudes PCT WO 98/48818, WO 01/56532 y WO 01/72328. Una composición que contiene APC puede ser generalmente una que es un producto liofilizado estable de alta pureza que comprende un agente de carga (tal como sacarosa, manitol, trehalosa y rafinosa), una sal (tal como cloruro de sodio y cloruro de potasio), un tampón (como citrato de sodio, Tris-acetato y fosfato de sodio) y APC. Por ejemplo, una composición liofilizada estable puede comprender una relación en peso de aproximadamente 1 parte de APC, entre aproximadamente 7 - 8 partes de sal, y entre aproximadamente 5 - 7 partes de agente de carga. Un ejemplo de dicha composición liofilizada estable es: 5,0 mg de APC, 30 mg de sacarosa, 38 mg de NaCl y 7,56 mg de citrato, pH 6,0, por vial.

40 C.1 Formulación administrada tópicamente

45 En una realización particularmente preferida, la APC se proporciona en forma de una composición o formulación que está adaptada para administración tópica a una lesión relevante de la piel, placa u otra superficie de la piel del sujeto del trastorno relevante según un método descrito en la Sección B anterior. Los ejemplos de tales formulaciones incluyen aquellos que se pueden aplicar directamente a la superficie relevante permitiendo la administración local de la APC al sitio relevante. Estas formulaciones incluyen geles, aceites, pulverizaciones, formulaciones en *roll-on*, pomadas, lociones, espumas y similares. En una realización, la APC se proporciona en la forma de un gel de metilcelulosa y puede contener estabilizantes tales como carbohidratos y sales.

50 Una pomada para la piel puede ser una combinación de ingredientes orgánicos, de salud, de belleza o medicinales, normalmente en una base de aceite de petróleo. Esto le da a la pomada para la piel una fórmula más espesa, menos soluble en agua que se mantiene sobre la superficie del cuerpo por más tiempo de manera que los ingredientes pueden funcionar más eficazmente para tratar una amplia variedad de problemas. Hay muchas pomadas para la piel naturales y orgánicas que se pueden obtener de compañías (tales como Therapex).

55 También se puede usar propionato de clobetasol (CP) espuma (al 0,05 %). Esta es una espuma de aerosol en emulsión que se ha utilizado para el tratamiento de las manifestaciones inflamatorias y pruríticas de las dermatosis sensibles a los corticosteroides en los Estados Unidos y para las manifestaciones inflamatorias y pruríticas de la dermatitis atópica de moderada a grave en Canadá (Olux-E (propionato de clobetasol) espuma, al 0,05 % Stiefel Laboratories Inc, Research Triangle Park, NC (2011)).

60 Cuando la formulación es un gel, puede contener APC en una cantidad de 10-5000 µg/g de gel.

C.2 Formulación inyectable

Una formulación particularmente preferida de APC es el producto comercializado por Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana, bajo la marca comercial Xigris™. Xigris™ se suministra como un polvo liofilizado estéril para perfusión intravenosa. Los viales de 5 mg de Xigris™ contienen 5,3 mg/vial de APC recombinante humana, 31,8 mg/vial de sacarosa, 40,3 mg/vial de NaCl, y 10,9 mg/vial de citrato de sodio, y los viales de 20 mg de Xigris™ contienen 20,8 mg/vial de APC recombinante humana, 124,9 mg/vial de sacarosa, 158,1 mg/vial de NaCl, y 42,9 mg/vial de citrato de sodio. Los viales se reconstituyen con agua estéril para inyección, USP, para dar una concentración de aproximadamente 2 mg/ml de APC, y esta APC diluida se añade entonces a una solución inyectable de cloruro de sodio al 0,9 % para dar una concentración de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000 µg/ml de APC para la administración a un paciente. Esta es una formulación particularmente preferida para la administración de APC mediante técnicas de inyección subcutánea como se describe en la Sección B anterior.

Tanto si se administra por vía tópica como por inyección subcutánea, en ciertas realizaciones, la formulación relevante puede contener proteína C como una alternativa, o en adición a la APC. Por ejemplo, se puede administrar una cantidad eficaz de proteína C que se activará *in vivo* mediante la ruta de la proteína C endógena para producir APC. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos nº 5.151.268 y la solicitud PCT WO 93/09807. Como se ha indicado anteriormente, la proteína C se puede purificar a partir del plasma o se puede preparar mediante técnicas de DNA recombinante. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 4.959.318, 4.981.952, 5.093.117, 5.151.268, 5.571.786, 6.156.734, 6.268.344, y 6.395.270. Se conocen composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden proteína C (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos números 5.151.268 y 5.571.786).

La producción endógena de APC se puede aumentar también administrando una cantidad de un agente que aumente la síntesis de proteína C en el animal. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT WO 93/09807. Los agentes adecuados incluyen esteroides anabólicos (por ejemplo, danazolol). Véase, por ejemplo, la solicitud PCT WO 93/09807.

En ciertas realizaciones, la producción endógena de APC se puede aumentar mediante la administración de una cantidad de un activador de proteína C eficaz para causar la producción de APC *in vivo* a partir de la proteína C sintetizada endógenamente y/o de la proteína C coadministrada. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT WO 93/09807. Un activador de proteína C es cualquier compuesto que causa o aumenta la generación de APC. Los activadores de proteína C adecuados incluyen trombina, α -trombina, trombina acilada en el sitio activo, análogos y mutantes de trombina (por ejemplo, trombina E192Q y trombina K52E), complejos solubles de trombina-trombomodulina, agentes que eviten la eliminación o descomposición de complejos de trombina-trombomodulina, agentes que mejoran la síntesis o retrasan la eliminación de la trombomodulina, un veneno (tal como Protac o veneno de víbora de Russel), factor Xa, plasmina, tripsina, y cualquier otro veneno, enzima o compuesto capaz de causar o aumentar la generación de APC a partir de la proteína C. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT WO 93/09807. Los activadores de proteína C preferidos son la trombina y la trombina acilada en el sitio activo.

En algunas realizaciones, se puede administrar APC con otro agente para controlar una o más de inflamación, proliferación celular y apoptosis. Un agente particularmente preferido es un anticuerpo anti-IL-17, en particular Ixekizumab, que presentó mejoras significativas en las puntuaciones de severidad de la enfermedad de la piel en comparación con placebo en un Estudio de Fase II en pacientes con psoriasis en placas crónica (NEJM, 2012). Otros ejemplos de agentes para controlar la inflamación incluyen inhibidores de TNF- α y citocinas antiinflamatorias y productos biofarmacéuticos.

Aspectos adicionales de la presente invención y otras realizaciones de los aspectos descritos en los párrafos precedentes se harán evidentes a partir de la siguiente descripción, dada a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos.

Ejemplos

Ejemplo 1 Ensayo preclínico que establece la actividad antiapoptótica selectiva de APC sobre los queratinocitos no inflamatorios, de crecimiento lento, y los queratinocitos de la piel con psoriasis

Se reclutan seis pacientes con psoriasis crónica activa en placas y 6 individuos normales. No han recibido ningún tratamiento durante al menos 4 semanas antes del muestreo. Se toman dos biopsias con punzón de 6 mm con anestesia local de la misma placa crónica. Se aíslan los queratinocitos como se ha descrito previamente (20).

Los queratinocitos normales se tratan con una mezcla de citoquinas [IL-1 α (10 ng/ml), IL-6 (5 ng/ml), TNF- α (5 ng/ml), IL-17A (10 ng/ml)] para inducir un fenotipo psoriásico. Se añade la APC a los queratinocitos a 1, 10 µg/ml y se tratan durante 24, 48 y 72 horas. La proliferación/supervivencia celular se examina utilizando el ensayo de MTT, ensayo de proliferación con BrdU (bromodesoxiuridina). Se examina la apoptosis celular por el ensayo de TUNEL, citometría de flujo (yoduro de propidio (PI) o PI más anexina-V). Se detecta la producción de citoquina y cuatro genes seleccionados asociados a psoriasis TNF, DEFB4, CAMP, PI3 mediante RT-PCR en tiempo real y ELISA. La

activación y expresión de las moléculas de señal apoptótica caspasa-3, 8 y 9 y MAK quinasa ERK se detectan mediante transferencia Western.

Los resultados mostrarán que la APC induce la apoptosis y ralentiza el crecimiento de los queratinocitos psoriásicos mientras que estimula el crecimiento y la supervivencia de los queratinocitos normales. La APC reduce también los niveles de citocinas inflamatorias IL-1, TNF- α , IL-17 e IL-6 y las moléculas asociadas a psoriasis TNF, DEFB4, CAMP, PI3. En las células de control normales que se tratan con mediadores inflamatorios, se aumenta el crecimiento celular y la adición de la APC invierte este efecto. En general, los resultados mostrarán claramente que la APC no solo puede inhibir la inflamación asociada con los queratinocitos psoriásicos, sino que también reduce la excesiva proliferación característica asociada con estas células.

Ejemplo 2. Un ensayo piloto de fase 2 con APC subcutánea durante 12 semanas

Selección de pacientes: Se inscriben 5 pacientes con psoriasis crónica severa en placas [Índice de gravedad y área de la psoriasis (PASI) ≥ 12 , superficie corporal (BSA) ≥ 10]. Los criterios de inclusión primarios incluyen pacientes de 18 a 70 años que han tenido psoriasis en placas estable durante al menos 6 meses. Los criterios de exclusión primarios incluyen: i) pacientes con psoriasis sin placas o psoriasis inducida por fármacos; ii) el uso de agentes biológicos tales como rituximab, abatacept, infliximab, adalimumab, ciclosporina o ácido micofenólico y etanercept o anakinra dentro de los 28 días previos al estudio iii) pacientes que han recibido tratamiento antipsoriásico, incluida cualquier fototerapia, durante las 8 semanas anteriores al estudio y tratamiento con cualquier terapia tópica estándar para la psoriasis que no sea con emolientes blandos durante las 4 semanas anteriores al estudio; iv) el uso de terapia tópica durante el estudio se limita a los glucocorticoides de clase III a VII en el cuero cabelludo, las axilas y las ingles solamente; v) evidencia de cualquier infección activa o reciente, o un historial de tumor maligno u otra enfermedad autoinmune, las mujeres embarazadas también son criterios de exclusión.

Tratamiento: Se administra a los pacientes 400 μ g de APC/placa por vía subcutánea dos veces por semana durante hasta 12 semanas o hasta que se resuelvan las placas. La APC se inyecta uniformemente alrededor (como se ha descrito previamente) de la periferia y bajo las placas psoriásicas y el vehículo solo (placebo) se inyecta de forma similar en placas de control localizadas simétricamente en el otro lado del cuerpo. Los pacientes son seguidos durante 4 semanas adicionales después del tratamiento final.

Medida: Se analizan el PASI, la evaluación global estática del médico (sPGA), el índice de calidad de vida en dermatología (DLQI), los sucesos adversos y los valores hematológicos y de laboratorio de rutina (por ejemplo, citocina, examen histológico, actividad PC/APC). Las consideraciones de seguridad incluyen riesgo de hemorragia, dolor de cabeza, fatiga, infección y alergia. Los sucesos celulares y bioquímicos relevantes incluyen recuentos de glóbulos blancos, neutrófilos y plaquetas; actividad de coagulación, niveles de PC/APC y formación de anticuerpos para APC en suero. Se toma una biopsia de 4 mm para realizar el examen histológico de PC/APC y EPCR, y la evaluación de los principales parámetros psoriásicos tales como acantosis, hiperqueratosis y paraqueratosis, la actividad mitótica de la epidermis, edema papilar, dilatación y tortuosidad de los capilares, y neutrófilos en la dermis, el estrato espinoso, así como en la capa córnea, respectivamente.

Análisis estadístico: Los valores de la línea base y los valores en las semanas durante el tratamiento y 4 semanas después del tratamiento se comparan en un nivel de significación de 0,05, utilizando una prueba t unilateral de 2 muestras.

Resultados y discusión: Se debe demostrar que el tratamiento con APC es seguro y bien tolerado y los pacientes mostrarán al menos un 60 % de resolución de las lesiones de psoriasis, y 3 de cada 5 pacientes mostrarán una resolución completa de la placa. El efecto de APC se mantendrá durante el seguimiento de 4 semanas. Todos los pacientes mostrarán mejores PASI, sPGA, DLQI y sin efectos adversos y no se formarán anticuerpos APC en respuesta al tratamiento. Se pueden observar reducciones significativas en el grosor de la epidermis y en las células inflamatorias en la piel, y un aumento en la expresión de los queratinocitos de EPCR, sin embargo, los niveles circulantes de PC/APC no se ven afectados. En general, los resultados mostrarán que la APC es segura, bien tolerada y altamente eficaz para las placas de psoriasis.

Ejemplo 3. Ensayo piloto de fase 2 con APC subcutánea para el acné vulgar en 10 pacientes

Selección de pacientes: Se inscriben 10 pacientes con acné vulgar. Los criterios de inclusión primarios incluyen: pacientes de 18 a 30 años que han tenido acné facial bilateral durante al menos 6 meses. Los criterios de exclusión primarios incluyen evidencia de cualquier infección activa o reciente, o un historial de tumor maligno u otra enfermedad autoinmune, mujeres embarazadas.

Tratamiento: Se administran a los pacientes 200 μ g de APC en forma de gel una vez al día durante 12 semanas o hasta que el acné se resuelve. Se les suministran a los pacientes dos tubos de gel marcados L y R y se les instruye para aplicar 2 cm de gel, exprimidos del tubo, a la zona afectada designada (L en el lado izquierdo de la cara y R en el lado derecho de la cara) y frotar uniformemente. Los pacientes son seguidos entonces durante 4 semanas adicionales después del tratamiento final.

Medida: Se toman fotografías antes del tratamiento y cada 4 semanas y se calcula el área del acné utilizando el análisis de imágenes asistidas por computadora. Se analizan los sucesos adversos y los valores hematológicos y de laboratorio rutinarios (por ejemplo, citoquina, examen histológico, actividad PC/APC). Se monitoriza la seguridad, incluido el riesgo de hemorragia, dolor de cabeza, fatiga, infección y alergia. Los sucesos celulares y bioquímicos relevantes incluyen recuentos de glóbulos blancos, neutrófilos y plaquetas; actividad de coagulación, niveles de PC/APC y formación de anticuerpos para APC en el suero.

Análisis estadístico: Se compararon los valores de la línea base y los valores en las semanas durante el tratamiento y 4 semanas después del tratamiento a un nivel de significación de 0,05, utilizando una prueba t unilateral de 2 muestras.

Resultados y discusión: El tratamiento con APC será seguro y bien tolerado y los pacientes mostrarán al menos una resolución del 50 % del acné. El efecto de la APC se mantendrá durante las 4 semanas de seguimiento. No habrá efectos adversos y no se formarán anticuerpos APC en respuesta al tratamiento. Debe haber reducciones significativas en el espesor de la epidermis y en las células inflamatorias en la piel, y un aumento en la expresión de queratinocitos de EPCR, sin embargo, los niveles circulantes de PC/APC no se ven afectados. En general, los resultados mostrarán que la APC es segura, bien tolerada y altamente eficaz para el acné vulgar.

Ejemplo 4. Formulación en gel y aplicación terapéutica

Este ejemplo ofrece un gel tópico a base de carboximetilcelulosa sódica no estéril, con baja carga biológica, conservado, que contiene el ingrediente activo proteína C activada y los siguientes ingredientes inactivos: carboximetilcelulosa sódica, ácido acético glacial, hidrocloreuro de l-lisina, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, acetato de sodio trihidrato, cloruro de sodio y agua para inyección. Cada gramo de gel contiene 100 µg de proteína C activada.

Ejemplo 5. Formulación en gel y aplicación terapéutica

El polímero Carbopol® Ultrez 30 (Lubrizol Advanced Materials, Inc) ofrece una buena viscosidad en combinación con goma de xantano en presencia de 1 % de ácido salicílico y 5 % de un extracto que contiene un electrolito, en esta formulación de proceso en frío a pH 4. El humectante Glucam™ E 20, junto con la glicerina, imparte humectación. A continuación está la fórmula.

		Nombre INCI, Nombre de fábrica	Peso %	Función
A.	1.	Agua desionizada	79,15	Diluyente
	2.	EDTA disódico, <i>Protachem NA2</i>	0,05	Agente quelante
	3.	Carbómero, <i>Carbopol® Ultrez 30 Polimer</i>	0,80	Modificador de la reología
B.	4.	Glicerina, <i>Glicerina, 99,7 % USP</i>	2,00	Humectante
	5.	Metil glucosa éter-20, <i>Glucam™ E-20 Humectante</i>	1,00	Humectante
	6.	Goma de xantano, <i>Keltrol® CG</i>	0,25	Espesante
C,	7,	Hidróxido de Sodio (Solución al 18 %)	1,75	Neutralizante
D.	8.	Butilenglicol	6,00	Solubilizante
	9.	Alcohol, <i>Alcohol etílico</i>	2,00	Solubilizante
E.	10.	Ácido salicílico	1,00	Agente antiacné
	11.	Aceite de ricino hidrogenado PEG-40, <i>Cremophor® CO-40</i>	0,25	Solubilizante
	12.	Lactato de laurilo, <i>Schercemol™ LL Ester</i>	0,25	Emoliente
F.	13.	Fenoxietanol (y) Etilhexilglicerina, <i>Euxy® PE 9010</i>	0,50	Conservante
	14.	Agua, glicerina	5,00	Antiirritante

Procedimiento:

1. Combinar los ingredientes de la PARTE D y mezclar hasta que los cristales de ácido salicílico estén completamente disueltos. Reservar para una adición posterior.

2. Disolver EDTA disódico en agua. Cuando el EDTA disódico esté completamente disuelto, fijar la velocidad de mezclado a 400-500 rpm y dispersar lentamente el polímero de Carbopol® Ultrez 30 en agua, continuar mezclando hasta que el polímero esté completamente hidratado.

3. Premezclar los ingredientes de la PARTE B en una suspensión uniforme. Añadir a la PARTE A. Aumentar la velocidad de mezclado según sea necesario para mantener la uniformidad.

4. Añadir la PARTE C a la PARTE A/B y aumentar la velocidad de mezclado según sea necesario para mantener la uniformidad. Continuar mezclando durante 10 minutos.

5. Añadir la PARTE D al lote y ajustar la velocidad de mezclado según sea necesario para reducir cualquier salpicadura debida al cambio de viscosidad. Mezclar hasta que sea uniforme.

6. Premezclar los ingredientes de la PARTE E y añadirlos al lote. Mezclar hasta que sea uniforme.

7. Añadir los ingredientes de la PARTE F individualmente con un buen mezclado entre adiciones.

La APC se agrega a una cantidad de 10-5000 µg/g de gel o de 0,01-0,05 % p/p

Este gel se puede aplicar directamente a las zonas de la lesión.

Ejemplo 6. Pulverización en formulaciones y aplicaciones terapéuticas

Se solubilizó APC en una solución estéril isotónica como se describió anteriormente para APC por inyección. La administración en pulverización se logró pasando los contenidos del vial a una jeringa de 2,5 ml utilizando una aguja de extracción. Se colocó una boquilla de pulverización esterilizada en el extremo de la jeringa (en lugar de la aguja) y se pulverizó el tratamiento (APC o solución salina) uniformemente sobre la placa para cubrir toda la superficie afectada. Por lo tanto, no se requirió ningún propelente para obtener la atomización, simplemente la presión aplicada a la jeringa. Se repitió la aplicación cuando fue necesario, preferiblemente una vez al día. Esta técnica es fácil de realizar y de repetir de manera consistente, proporcionando una cobertura uniforme de tratamiento.

Ejemplo 7. Técnicas para la evaluación del efecto antiapoptótico sobre los queratinocitos normales y del efecto apoptótico sobre los queratinocitos hiperproliferativos.

Según la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de APC proporciona generalmente un efecto antiapoptótico sobre los queratinocitos normales y un efecto apoptótico sobre los queratinocitos hiperproliferativos. Este resultado se puede evaluar *in vitro* o *in situ* de la siguiente manera:

Método 1 *in vitro*.

La piel psoriásica activa no tratada se separa utilizando un punzón de biopsia y se aíslan los queratinocitos. En resumen, las células (3000 células/pocillo) se siembran en placas de 96 pocillos hasta un volumen final de 200 µl, después se incuban durante 4 horas para permitir que las células se adhieran. Se tratan entonces las células con APC a 0,1, 1 y 10 µg/ml durante 72 horas.

1) Tasa de supervivencia/crecimiento celular mediante ensayo de MTT: En este ensayo, las deshidrogenasas mitocondriales de células viables escinden el anillo de tetrazolio, produciendo cristales de formazano de MTT púrpura que son insolubles en soluciones acuosas. Los cristales se pueden disolver en isopropanol acidificado. La solución púrpura resultante se mide espectrofotométricamente. Un aumento en el número de células da como resultado un aumento en la cantidad de formazano de MTT formado y un aumento en la absorbancia. Tres horas antes de completar el tratamiento, se añaden a las células 10 µl de MTT a 5 mg/ml. Después de una incubación adicional de 3 horas, la solución de MTT se separa y se reemplaza por 100 µl de DMSO. Se determina la densidad óptica de cada pocillo a una longitud de onda de 570 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm. La viabilidad de las células está directamente relacionada con la densidad óptica. La APC redujo la viabilidad de una manera dependiente de la dosis.

2) La detección de la tasa de apoptosis se hizo por ensayo de TUNEL, análisis FACS con yoduro de propidio (PI) o PI más anexina-V) y actividad de caspasa activa.

El ensayo de TUNEL se realiza utilizando un kit de detección de muerte celular *in situ* según las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics Australia Pty. Ltd., NSW, Australia). En resumen, las células se permeabilizan con Triton X-100 al 0,1 % en citrato de sodio al 0,1 % recientemente preparado, y se incuban con desoxinucleotidil transferasa terminal en presencia de dUTP marcado con fluoresceína (60 min a 37 °C). Las células TUNEL positivas se visualizaron utilizando una reacción de un anticuerpo conjugado con anti-fluoresceína peroxidasa (POD) y del sustrato POD. Las secciones se tiñeron por coloración de contraste con DAPI. La frecuencia de células apoptóticas fue determinada por un investigador a ciegas contando las células TUNEL positivas y el número total de células bajo una vista de gran aumento (40 x) y calculando el porcentaje de células TUNEL positivas.

Análisis de FACS: Los queratinocitos se tripsinizan y se lavan con tampón de lavado FACS (PBS con FCS al 5 %). Una suspensión celular de 200 µl se incubaba con yoduro de propidio (PI) o PI más anexina-V o anticuerpos conjugados, y posteriormente se detecta mediante un citómetro de flujo para ciclos celulares/apoptosis celulares y expresión de proteínas. Los datos se analizan utilizando el software FlowJo.

La actividad de la caspasa activa se detecta por transferencia Western. Después del tratamiento, se lavan los queratinocitos tres veces con PBS y tampón de lisis (NaCl 0,15 M, PMSF 0,01 mM, NP-40 al 1 %, Tris 0,02 M, urea 6 M/H₂O) complementado con inhibidor de proteasa e inhibidor de fosfato (Roche, Indianápolis, IN, USA). Los lisados celulares se centrifugan a 10.000 g durante 15 minutos y los sobrenadantes se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10 % (SDS-PAGE) y se transfieren a una membrana de PDVF. Se detectan 8 y 9 anticuerpos anti-caspasa-3 humanos. La inmunoreactividad se detecta utilizando el sistema de detección ECL (Amersham, Piscataway, NJ). Se incluyó el anticuerpo anti-β-actina humano para normalizar frente a una carga desigual.

En todos los ensayos de apoptosis, la APC promueve la apoptosis de los queratinocitos de crecimiento rápido.

Método 2 *in vitro*.

El objetivo es determinar si los queratinocitos procedentes de las placas tratadas con APC son más propensos a la apoptosis que las células tratadas con placebo. Se administra APC a placas psoriásicas (~ 5 - 50 cm² de tamaño) utilizando 2 métodos: i) inyección tópica (100 ng - 1 mg); ii) pulverización de una solución (10 ng - 1 mg), utilizando una boquilla de pulverización esterilizada en el extremo de una jeringa de 0,5 ml). La piel psoriásica activa tratada con APC o con placebo se separa utilizando punciones de biopsia y se aíslan los queratinocitos. Las células se miden inmediatamente para la apoptosis usando análisis FACS, como se ha descrito anteriormente. Los resultados indicaron que hay niveles significativamente más altos de células apoptóticas procedentes de la piel tratada con APC, en comparación con la piel tratada con placebo.

Método *in situ*

Apoptosis celular *in situ*: El objetivo es determinar si los queratinocitos de las placas tratadas con APC son más propensos a la apoptosis que las células tratadas con placebo. Se administra APC a placas psoriásicas (~ 5 - 50 cm² de tamaño) utilizando 2 métodos: i) inyección tópica (100 ng - 1 mg); ii) pulverización de una solución (10 ng - 1 mg), utilizando una boquilla de pulverización esterilizada en el extremo de una jeringa de 0,5 ml). La piel psoriásica activa tratada con APC o con placebo se separa utilizando punciones de biopsia. La piel se fija y la apoptosis celular se detecta utilizando un kit de detección de muerte celular *in situ* según las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics Australia Pty. Ltd., NSW, Australia). En resumen, las células se permeabilizan con Triton X-100 al 0,1 % en citrato de sodio al 0,1 % recién preparado, y se incuban con desoxinucleotidil transferasa terminal en presencia de dUTP marcado con fluoresceína (60 min a 37 °C). Las células TUNEL positivas se visualizan utilizando una reacción de un anticuerpo conjugado con anti-fluoresceína peroxidasa (POD) y del sustrato POD. Las secciones se tiñen por coloración de contraste con DAPI. La frecuencia de células apoptóticas es determinada por un investigador a ciegas contando las células TUNEL positivas y el número total de células bajo una vista de gran aumento (40 x) y calculando el porcentaje de células TUNEL positivas. La piel tratada con APC tiene niveles significativamente más altos de células apoptóticas TUNEL positivas en comparación con la piel tratada con placebo.

Modelo de ratón de psoriasis

Se realiza el modelo de ratón SCID de psoriasis con xenoinjerto (se requieren 82 ratones) como se ha descrito previamente (Raychaudhuri, 2001 Br. J. Dermatol). En resumen, se injertan placas psoriásicas humanas (1 cm²) en la espalda de ratones SCID de ~8 semanas de edad después de separar una muestra de piel de espesor completo. Los injertos psoriásicos son aceptados en 3-4 semanas y la enfermedad tipo psoriasis se mantiene durante al menos 10 semanas. Se administra APC después del desarrollo de la psoriasis utilizando 2 métodos: i) inyección intradérmica (10 ng - 100 µg); ii) pulverización de una solución (10 ng - 100 µg), utilizando una boquilla de pulverización esterilizada en el extremo de una jeringa de 0,5 ml) sobre la piel afectada (8/grupo) 3 veces/semana durante hasta 8 semanas. La solución salina fisiológica se utiliza como control placebo. Las biopsias tomadas con punzón (2 mm) el día 0 (antes del tratamiento) y el día 28 (después del tratamiento) se congelan rápidamente y se procesan para inmunotinción e histología para determinar el espesor epidérmico, la longitud de las crestas epidérmicas (un indicador de espesor epidérmico) y los infiltrados celulares inflamatorios. El día 28, se recoge la piel para medir los mediadores inflamatorios, los marcadores de diferenciación y las proteínas de unión. El tratamiento con APC reduce el grosor de la piel y el número de células inflamatorias, particularmente los neutrófilos y las células T. Las citocinas inflamatorias en la piel tratada con APC se reducen, particularmente el factor-α de necrosis tumoral y las proteínas asociadas a la unión aumentan, especialmente la zona occludens-1 claudinas, ocludinas y JAM-A, en comparación con el placebo.

Proliferación celular utilizando incorporación de BrdU: Para lograr el etiquetado de las células sometidas a la síntesis de DNA, los ratones adultos reciben una inyección de BrdU (100 mg/kg) 2 h antes de la eutanasia, y las pieles de ratón se recogen y se fijan con formalina al 10 %. Las células proliferativas se detectan por inmunotinción con anticuerpo anti-BrdU. Las células tratadas con APC presentan una incorporación de BrdU significativamente menor que indica una menor capacidad proliferativa.

Ejemplo 8. Un ensayo piloto de fase 2 con APC subcutánea durante un mes en cinco pacientes

Pacientes

Pacientes de 18 a 70 años que tenían psoriasis en placas estable durante al menos 6 meses, que habían recibido o eran candidatos para recibir fototerapia o terapia sistémica de psoriasis.

5 Exclusiones

Pacientes con psoriasis sin placas o inducida por fármacos.

10 Pacientes que habían recibido tratamiento antipsoriásico, incluida cualquier fototerapia, durante las 8 semanas anteriores al estudio y tratamiento con cualquier terapia tópica estándar para la psoriasis que no fuera con emolientes suaves durante las 4 semanas precedentes al estudio. El uso de la terapia tópica durante el estudio estaría limitado a los glucocorticoides de clase III a VII en el cuero cabelludo, axilas e ingles solamente.

15 Pacientes con evidencia clínica de infección durante 3 semanas antes del estudio y pacientes con antecedentes de cáncer.

Diseño del estudio

Un ensayo piloto de fase 2 con APC subcutánea (100 ng) semanalmente durante un mes en cinco pacientes.

20 Protocolo de administración de APC.

Se eligen para el tratamiento con APC cinco pacientes varones, por lo demás sanos, con psoriasis en placas crónica. El fármaco se administra semanalmente durante un período de 4 semanas en una dosis de 100 µg.

25 La APC se inyecta por vía subcutánea directamente debajo de las placas psoriásicas y el vehículo solo (placebo) se inyecta bajo una placa de control localizada simétricamente en el otro lado del cuerpo. Se selecciona para el estudio una placa de control comparable a las otras dos sin ninguna inyección.

Informes

Análisis descriptivo (basal)

30 Los datos demográficos iniciales (edad, peso, IMC, etnia) y características de la enfermedad (duración de la psoriasis, porcentaje de área corporal afectada por psoriasis, puntuación PASI media, presencia de psoriasis marcada o severa), evaluados por medio de la evaluación global estática del médico, tratamiento tópico previo, fototerapia previa, terapia sistémica previa, terapia biológica previa.

35 Evaluaciones de eficacia y seguridad

Eficacia desde el día 1 (antes de la terapia) hasta 3 días después del final de la terapia (día 31) mediante documentación fotográfica y/o ultrasonido de 20 MHz.

40 Tres placas diferentes (incluyendo el sitio de administración de APC y del vehículo) se monitorizan en detalle en cada paciente para determinar la reducción en la banda pobre en eco (que representa tanto la acantosis epidérmica como el infiltrado en la dermis superior) el porcentaje de mejora en el Índice de gravedad y área de la psoriasis (PASI) de cada paciente.

45 Biopsias cutáneas (biopsias con punzón de 4 mm) 4 días antes de APC, a la semana y el día 24 (final de la terapia) para examen histológico e inmuno-histoquímico, así como mRNA.

Histología e inmunohistoquímica

50 Las investigaciones histológicas incluyen la evaluación de los principales parámetros psoriásicos tales como acantosis, hiperqueratosis y paraqueratosis, la actividad mitótica de la epidermis, edema papilar, dilatación y tortuosidad de los capilares y neutrófilos en la dermis, estrato espinoso, así como en la capa córnea, respectivamente.

Investigaciones inmunohistoquímicas

55 Seguridad

Sucesos adversos, sucesos adversos graves, valores hematológicos y de laboratorio de rutina, formación de anticuerpos frente a APC.

60 Efectos secundarios y prurito

Tipo retrasado de reacción de hipersensibilidad (DTH)

Referencias

65 1. Chiricozzi, A., Guttman-Yassky, E., Suarez-Farinas, M., Nograles, E., Tian, S., Cardinale, L., Chimenti, S., and Krueger, J.G. (2011) J Invest Dermatol 131, 677-687

2. Nestlé, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., and Nickoloff, B.J. (2009) *Nat Rev Immunol* 9, 679-691

5 3. Pasparakis, M. (2009) *Nat Rev Immunol* 9, 778-788

4. Pasparakis, M. (2012) *Immunol Rev* 246, 346-358

5. Zanni, G.R. (2012) *Consult Pharm* 27, 86-88, 90, 93-86

10 6. Berth-Jones, J., and Hutchinson, P.E. (1992) *Br J Dermatol* 127, 71-78

7. Kurian, A., and Barankin, B. (2011) *Skin Therapy Lett* 16, 4-7

8. Tran, B. and Feldman, S.R. (2011) *J Dermatolog Treat* 22, 18-26

15 9. Herrier, R.N. (2011) *American Journal of Health-System Pharmacy* 68, 795-806

10. Montesu, M.A., Addis, GM, Satta, R., and Cottoni, F. (2011) *G Ital Dermatol Venereol* 146, 273-281

20 11. Wallis, R.S. (2011) *Infect Dis Clin North Am* 25, 895-910

12. Esmon, C.T. (2004) *Crit Care Med.* 32, S298-S301

25 13. Xue, M., Campbell, D., and Jackson, C.J. (2007) *Journal of Biological Chemistry* 282, 13610-13616

14. Xue, M., Campbell, D., Sambrook, PN, Fukudome, K., and Jackson, C.J. (2005) *J Invest Dermatol.* 125, 1279-1285

30 15. Esmon, C.T. (2004) *Maturitas* 47, 305-314

16. Yuksel, M., Okajima, K., Uchiba, M., Horiuchi, S., and Okabe, H. (2002) *Thromb.Haemost.* 88, 267-273

17. Xue, M., March, L., Sambrook, P.N., Fukudome, F., and Jackson, CJ (2007) *Ann.Rheum.Dis.*

35 18. Xue, M., March, L., Sambrook, P.N., and Jackson, C.J. (2007) *Arthritis Rheum.* 56, 2864-2874

19. Lay, A.J., Donahue, D., Tsai, M.J., and Castellino, F.J. (2007) *Blood* 109, 1984-1991

40 20. Xue, M., Thompson, P., Kelso, I., and Jackson, C. (2004) *Exp Cell Res* 299, 119-127

21. van Zonneveld, A.J., de Boer, H. C., van der Veer, E.P., and Rabelink, T.J. (2010) *Annals of the Rheumatic Diseases* 69, i57-i60

45 22. Feistritzer, C, and Riewald, M. (2005) *Blood* 105, 3178-3184

23. Finigan, J.H., Dudek, S.M., Singleton, P.A., Chiang, E.T., Jacobson, J.R., Campamento, S.M., Ye, S.Q., and Garcia, J.G. (2005) *J. Biol.Chem.*

50 24. Xue, M., Chow, S.O., Dervish, S., Chan, Y.K., Julovi, S.M., and Jackson, C.J. (2011) *Journal of Biological Chemistry* 286, 6742-6750

25. Vetrano, S., Ploplis, V.A., Sala, E., Sandoval-Cooper, M., Donahue, D.L., Correale, C, Arena, V., Spmelli, A., Repici, A., Malesci, A. , Castellino, F.J., and Danese, S. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 19830-19835

55 26. Uchiba, M., Okajima, K., Oike, Y., Ito, Y., Fukudome, K., Isobe, H., and Suda, T. (2004) *Circ Res* 95, 34-41

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína C activada para uso en el tratamiento de un trastorno de la piel caracterizado por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos, en donde el tratamiento comprende poner en contacto una región de la piel caracterizada por la presencia de queratinocitos hiperproliferativos con una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada.
- 10 2. Una proteína C activada para uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento con una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada:
- 15 a) minimiza la inflamación en la región de la piel;
b) inhibe la apoptosis de los queratinocitos normales en la región de la piel; y/o
c) no inhibe el crecimiento de los queratinocitos normales, ni induce la proliferación de los queratinocitos normales.
- 20 3. Una proteína C activada para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cantidad de proteína C activada terapéuticamente eficaz es de 1 μg a 5 mg de proteína C activada por cm^2 de la región de la piel.
- 25 4. Una proteína C activada para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la proteína C activada está en la forma de un gel, crema, pomada, pulverización, loción o formulación similar adaptada para el contacto con la superficie de la piel.
- 30 5. Una proteína C activada para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína C activada está en la forma de una composición adaptada para inyección subcutánea.
- 35 6. Una proteína C activada para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno de la piel se caracteriza por uno o más de los siguientes procesos: apoptosis, inflamación, función de barrera deteriorada.
- 40 7. Una proteína C activada para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno de la piel es psoriasis o dermatitis herpetiforme.
- 45 8. Una proteína C activada para uso según la reivindicación 7, en donde la psoriasis es psoriasis no pustulosa, preferiblemente psoriasis vulgar o psoriasis eritrodérmica.
- 50 9. Una proteína C activada para uso según la reivindicación 7, en donde la psoriasis es psoriasis pustulosa, preferiblemente psoriasis pustulosa generalizada, pustolosis palmaris et plantaris, psoriasis pustulosa anular, acrodermatitis continua o impétigo herpetiforme.
- 55 10. Una proteína C activada para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la región de la piel en contacto con la proteína C activada es una placa psoriásica.
- 60 11. Una proteína C activada para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye la etapa adicional de proporcionar un agente antiinflamatorio al individuo.
12. Una proteína C activada para uso según la reivindicación 1, en donde el trastorno de la piel es acné y en donde el tratamiento comprende aplicar una composición que incluye una cantidad de proteína C activada terapéuticamente eficaz para el acné.
13. Una proteína C activada para uso según la reivindicación 1, en donde el trastorno de la piel es dermatitis atópica y en donde el tratamiento comprende aplicar una composición que incluye una cantidad de proteína C activada terapéuticamente eficaz para la dermatitis atópica.
14. Una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada para uso según la reivindicación 1.
15. Una composición para uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento con una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína C activada minimiza el trastorno de la piel.

Figura 1

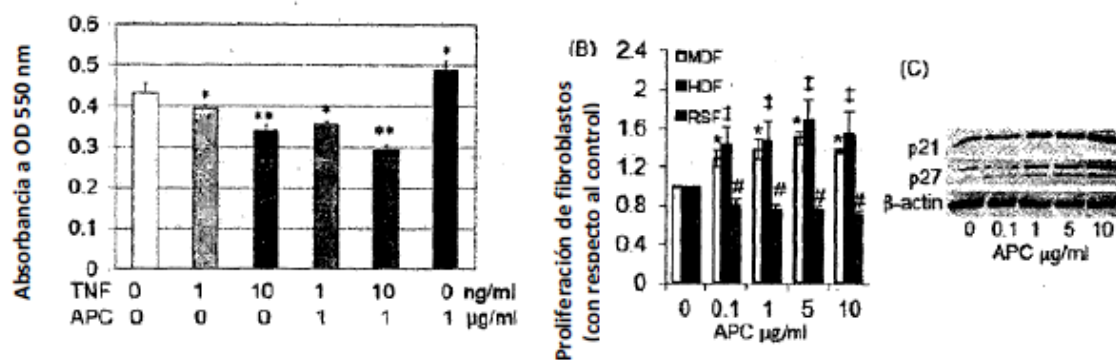


Figura 2

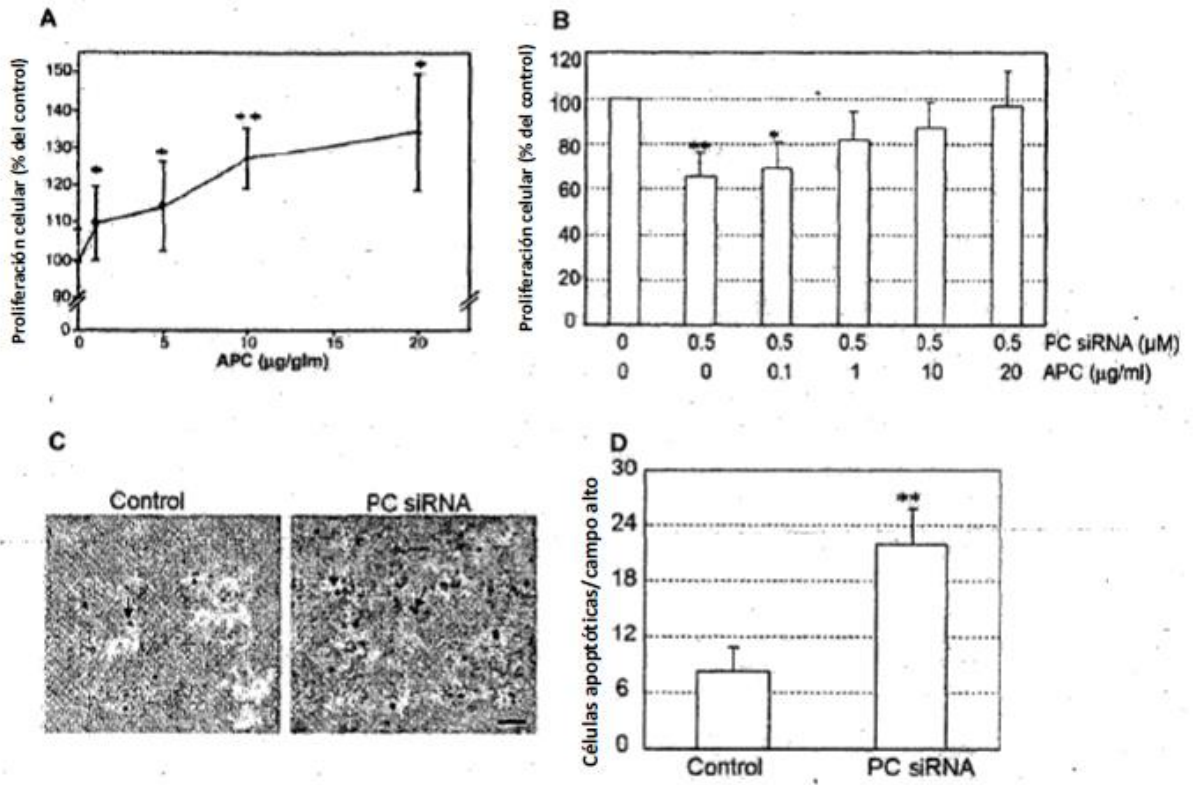


Figura 3

