

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901992694A1

Publication Date

20130502

Applicant

SAMPO S.R.L.

Title

PREPARATO TOPICO PER INDURRE LA PIGMENTAZIONE CUTANEA E
PER IL TRATTAMENTO DI DISCROMIE CUTANEE E VITILIGINE.

PREPARATO TOPICO PER INDURRE LA PIGMENTAZIONE CUTANEA E PER IL TRATTAMENTO DI DISCROMIE CUTANEE E VITILIGINE

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda un preparato topico per indurre la pigmentazione cutanea e per il trattamento di discromie cutanee e vitiligine. Più in particolare, l'invenzione concerne un metodo per intensificare la pigmentazione epidermica, sia a scopo meramente estetico che a scopo terapeutico, così da ottenere un'intensificazione del colorito o la ripigmentazione di zone epidermiche depigmentate in seguito a vitiligine o ad altre patologie cutanee ipopigmentarie, il quale metodo si avvale dell'applicazione di un prodotto cutaneo a base di NGF (nerve growth factor).

Antefatto dell'invenzione

Per ottenere una carnagione più scura con un effetto di abbronzatura senza esposizione al sole, o per rinforzare l'abbronzatura naturale ottenuta in seguito ad una ridotta esposizione, o anche per farla durare più a lungo, sono in uso prodotti da applicare sulla pelle, generalmente definiti "autoabbronzanti". Tali prodotti vengono utilizzati spesso come alternativa alla tradizionale esposizione al sole per evitare il rischio di conseguenze associate all'eccessiva esposizione al sole, quali eritemi, invecchiamento cutaneo precoce e aumentato rischio di tumori della pelle.

I prodotti correntemente usati per l'abbronzatura senza esposizione al sole sono basati sulla reazione di un composto chimico attivo presente nel prodotto con gli amminoacidi della pelle. Sono noti diversi composti chimici di questo tipo, tra cui il più diffuso è il diidrossiacetone (DHA). Quando applicato, il DHA interagisce con le cellule morte poste nello strato corneo dell'epidermide, causando un cambiamento di colore dello strato

superficiale con un effetto simile all'abbronzatura, che si produce da 2 a 4 ore dopo l'applicazione e dura generalmente da cinque a sette giorni dopo l'applicazione iniziale.

Benché raccomandati per l'uso come un'alternativa più sicura dell'irraggiamento solare diretto o dell'irraggiamento UV, gli agenti autoabbronzanti come il DHA presentano una serie di svantaggi, tra cui la capacità di macchiare i tessuti, l'attitudine a dare una colorazione non omogenea alla pelle e in genere un odore caratteristico non gradevole.

Un altro campo in cui si richiede un trattamento che sia in grado di scurire efficacemente la pelle è quello delle patologie cutanee ipopigmentarie, tra cui la più nota è la vitiligine.

La vitiligine è una patologia dermatologica non contagiosa piuttosto comune, caratterizzata da un disturbo della pigmentazione cutanea, che si manifesta con la comparsa di chiazze irregolari e dai margini netti, di forma ed estensione molto variabili, nelle quali la cute appare depigmentata. La depigmentazione è dovuta all'assenza o alla riduzione dei melanociti e della melanina, il pigmento da essi prodotto, nelle zone cutanee colpite.

Le chiazze depigmentate possono comparire in qualsiasi parte del corpo, ma le sedi più comunemente interessate sono le mani, le ascelle, la cute delle regioni anogenitali, periorali e periorbitali. Spesso i margini delle chiazze sono iperpigmentati, cosa che ne evidenzia il contrasto con il colore della cute normalmente pigmentata circostante. L'insorgenza della vitiligine è indipendente dal sesso e dal colore della pelle e dei capelli dei soggetti colpiti, e la sua manifestazione è, quindi, tanto più evidente quanto più è scura la carnagione del soggetto colpito. A parte la modificazione cromatica, la pelle delle zone colpite è assolutamente normale, ad eccezione delle zone ricoperte da peli (in particolare, sul viso), che diventano bianchi e spesso cadono.

Col tempo le chiazze possono estendersi progressivamente, a volte invece esse rimangono stazionarie, ma raramente regrediscono. Il decor-

so della malattia può essere aggravato da traumi psichici e da stati ansiosi.

L'incidenza percentuale della vitiligine, che sembra manifestarsi con maggiore frequenza tra i 20 e i 40 anni d'età ma colpisce anche in età pediatrica, si rivela superiore nei paesi industrializzati (dove arriva anche al 3-4% della popolazione), mentre l'incidenza globale sarebbe dell'1%.

L'origine della vitiligine è sconosciuta, anche se si sospettano fattori autoimmuni e/o predisposizione genetica, e sono state formulate varie teorie patogenetiche, tra cui le più accreditate sono la teoria autoimmune, la teoria autocitotossica e la teoria neurale o neurogena. Nessuna di esse è risultata finora in grado di spiegare soddisfacentemente la comparsa delle tipiche chiazze cutanee depigmentate, e l'unico dato certo è che, esaminando al microscopio un frammento di cute prelevato dalla zona acromica, si riscontra l'assenza di melanociti e la totale mancanza di melanina, il pigmento a cui si deve il colore della pelle.

Per cause finora praticamente ignote, pertanto, i melanociti possono risultare numericamente ridotti, sostituiti da altre cellule o resi incapaci di sintetizzare la melanina: in tal caso le cellule che dallo strato basale dell'epidermide risalgono verso gli strati superiori dell'epidermide saranno prive di melanina e, una volta affiorate in superficie, daranno luogo alla comparsa di una chiazza acromica.

L'opzione estetica più rapida ed utilizzata per affrontare discromie cutanee come la vitiligine è l'applicazione di cosmetici in grado di dissimulare le zone depigmentate. Nei casi di depigmentazioni particolarmente estese vengono utilizzati prodotti depigmentanti topici, come l'idrochinone o il monobenzone, che servono ad aggirare il problema, andando ad eliminare i settori di pigmento limitrofi alle chiazze in modo da creare un'omogeneità di colore sulla pelle.

Poiché è generalmente riconosciuto che i melanociti subiscono degenerazione in seguito ad un'inflammatione locale, che potrebbe essere

di origine autoimmune, la terapia principale per la vitiligine è basata sugli agenti immunomodulatori topici (in particolare, corticosteroidi), che vengono applicati sulle zone depigmentate, in genere in combinazione con irraggiamento di luce ultravioletta (UV). Altri trattamenti noti includono l'applicazione di vitamina D₃ attivata o di agenti fotosensibilizzanti (psoraleni), sempre in combinazione con irraggiamento di luce ultravioletta (UV).

Un approccio terapeutico correntemente accettato ed attualmente diffuso per il trattamento della vitiligine è rappresentato dalla terapia con psoraleni in associazione con irraggiamento di ultravioletti limitato al campo degli UV-A, anche nota come terapia PUVA o PUVA-terapia. Questa si è dimostrata in grado di migliorare efficacemente lo stato di depigmentazione cutanea in circa il 50% dei casi, mentre gli steroidi sono limitatamente efficaci solo in casi di vitiligine a rapida diffusione, e spesso la malattia si manifesta di nuovo dopo che la terapia è stata sospesa.

L'ultima risorsa terapeutica, quando tutti gli altri trattamenti si sono dimostrati inefficaci o inapplicabili, è rappresentata dal trattamento chirurgico mediante innesti di pelle sana.

Tra le sostanze che sono state trovate potenzialmente in grado di aumentare la pigmentazione cutanea sono state particolarmente studiate la capsaicina, la curcumina e la piperina. Si tratta di sostanze rispettivamente contenute nel peperoncino, nel curry e nel pepe nero, che possono essere efficaci nel controllare la progressione della vitiligine: l'impiego di questi antiossidanti naturali per la cura della malattia è emerso, in particolare, da un'indagine biochimica condotta *in vitro* su colture primarie di cheratinociti.

È stato rilevato sperimentalmente che alcune applicazioni di piperina e di alcuni suoi derivati sintetici sulla cute di topi da laboratorio, abbinate o meno alla fototerapia con raggi ultravioletti, rendevano più scura la pelle dei roditori in sei settimane. L'effetto è stato più evidente e duraturo per il trattamento abbinato con irraggiamento UV. Tale uso terapeutico

della piperina è descritto anche nella domanda di brevetto internazionale pubbl. No. **WO 00/02544** (a nome BTG International Ltd.), mentre il brevetto **US 7361685** (cessionaria la Oregon Health and Science University) estende tale l'applicazione ad una classe di derivati della piperina. Di conseguenza, creme a base di piperina o anche di capsaicina come agonisti dei recettori vanilloidi cutanei TRPV1 e modulatori della melanogenesi sono state proposte per il trattamento di acromie e ipocromie cutanee come la vitiligine.

Uno dei meccanismi che sono stati ipotizzati analizzando i risultati terapeutici ottenuti nel trattamento della vitiligine con la terapia PUVA è una riduzione nei livelli locali di nerve growth factor (NGF). Già intorno agli anni '90 era stato suggerito che una aumentata espressione del recettore di NGF poteva essere associata con la distruzione dei melanociti cutanei (Yaar M. et al., J. Clin. Invest., **1994**), dando come risultato una depigmentazione cutanea.

In linea con gli effetti negativi dei neuromediatori locali sulla pigmentazione cutanea, è stata documentata nelle chiazze di cute con vitiligine una sensibilità locale ridotta, nonché la presenza di terminazioni nervose in uno stato degenerativo (Breathnach A., et al., J. Invest. Dermatol., **1992**). Studi *in vitro* hanno anche dimostrato che un altro neuromediatore chiamato neurotensina può aumentare l'infiammazione locale e peggiorare la pigmentazione cutanea nella vitiligine attraverso l'induzione di TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) da parte dei melanociti (Kovacs SO. J. Am. Acad. Dermatol., **1998**).

Come è noto, il nerve growth factor è una molecola capostipite di una complessa famiglia di neurotrofine, ben conosciuta per la sua azione trofica, tropica e differenziativa sui neuroni colinergici del sistema nervoso centrale e sul sistema simpatico periferico. È prodotta in molti tessuti di mammiferi, uomo compreso, e viene rilasciata nel torrente circolatorio in quantità più elevate durante la crescita e la differenziazione del sistema

nervoso. Studi biologici, biochimici e molecolari condotti su sistemi cellulari *in vitro* hanno messo in evidenza una elevatissima omologia tra il NGF murino e quello umano. Inoltre, nell'uomo come in altre specie animali il NGF è normalmente presente sia nel liquor cerebrospinale che nel torrente ematico a concentrazioni dell'ordine di 10-15 pg/ml, che aumentano in alcune patologie infiammatorie (malattie autoimmuni, allergiche, ecc.) e diminuiscono in altre (diabete).

Il NGF è stato scoperto dalla Prof. Rita Levi-Montalcini, nell'istituto di Zoologia della Washington University di St. Louis (Levi-Montalcini R., Harvey Lect., 60:217, **1966**) ed ha rappresentato un passo importante nello studio dei meccanismi di crescita e di differenziazione della cellula nervosa, essendo in grado di influenzare lo sviluppo e il mantenimento delle funzioni biologiche e la rigenerazione dei neuroni. Per la scoperta di questa molecola, per averne caratterizzato il ruolo biologico sia nel sistema nervoso periferico che in quello centrale, nel 1986 fu assegnato alla Prof. R. Levi-Montalcini il premio Nobel per la Medicina e Fisiologia.

Numerosi studi sperimentali *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato l'importanza fisiopatologica del NGF nel prevenire il danno neuronale di natura chirurgica, chimica, meccanica ed ischemica, rendendolo il candidato ideale per l'impiego nella terapia di numerose patologie del sistema nervoso centrale e periferico (Hefti F., J. Neurobiol., 25:1418, **1994**; Fricke J., Lancet, 349:480, **1997**). Infatti, già da diversi anni sono state effettuate prove cliniche su pazienti affetti dal morbo di Parkinson e dalla malattia di Alzheimer, mediante somministrazione intracerebrale di NGF murino (si veda, ad es., Olson L. et al., J. Neural Trans.: Parkinson's Disease and Dementia Section, 4: 79, **1992**). I risultati di tali studi hanno confermato le osservazioni fatte su modelli animali ed hanno messo in evidenza l'assenza di possibili effetti collaterali in seguito alla somministrazione di NGF murino. Questa caratteristica è stata confermata successivamente per il NGF umano ricombinante (Petty B.G. et al., Annals of Neurology,

36:244-246, **1994**).

Gli studi sulla caratterizzazione degli effetti biologici, biochimici, molecolari, preclinici e clinici del NGF sono stati condotti quasi esclusivamente con il NGF isolato dalle ghiandole sottomandibolari di roditori adulti, quindi la più ampia quantità di dati acquisiti riguarda attualmente il NGF murino. Le proprietà biochimiche di quest'ultimo sono state descritte, in particolare, in un lavoro che risale al 1968 (Levi-Montalcini R. e Angeletti P.U., *Physiological Reviews*, 48:534, **1968**).

Il NGF contenuto nelle ghiandole salivari di topo è un complesso molecolare di 140 kdalton, con coefficiente di sedimentazione pari a 7S, costituito da tre subunità, α , β e γ , la seconda delle quali rappresenta la forma attiva vera e propria. Quest'ultima, detta β NGF, a coefficiente di sedimentazione pari a 2,5S, viene normalmente estratta e purificata seguendo tre metodologie non molto diverse tra di loro (Bocchini V., Angeletti P.U., *Biochemistry*, 64:787-793, **1969**; Varon S. et al., *Methods in Neurochemistry*, 203-229, **1972**; Mobley W.C. et al., *Molecular Brain Research*, 387: 53-62, **1986**). Il β NGF così ottenuto è a sua volta un dimero costituito da due catene identiche di 118 amminoacidi, del peso molecolare complessivo di circa 26.000 dalton. Ogni singola catena è stabilizzata da tre ponti disolfuro, mentre delle forze di legame non covalente garantiscono la formazione della struttura dimerica. Tale molecola, essendo molto stabile, risulta solubile pressoché in qualsiasi solvente sia acquoso che oleoso, conservando inalterate le proprie caratteristiche biochimiche e l'attività biologica. Ulteriori dettagli sulla struttura e sulle proprietà fisiche e biochimiche della molecola sono riportati in Greene, L.A. e Shooter, E.M., *Ann. Rev. Neurosci.* 3:353, **1980**.

Di recente, la struttura del β NGF è stata ulteriormente chiarita mediante un'analisi cristallografica. Questa ha rilevato la presenza di tre coppie antiparallele di filamenti, con struttura secondaria di tipo β , in grado di

formare una superficie piana lungo la quale si associano le due catene per dare il dimero attivo. Su tali catene del β NGF si è evidenziata la presenza di quattro regioni "loop" in cui sono localizzati molti amminoacidi variabili ai quali, probabilmente, è legata la specificità di riconoscimento da parte del recettore.

È noto che l'effetto biologico del NGF è mediato da due recettori presenti sulla superficie delle relative cellule bersaglio, il recettore ad alta affinità TrkA (tirosinchinasi A) e quello a bassa affinità p75. Esistono numerosi anticorpi che inibiscono selettivamente l'effetto biologico del NGF, la cui esistenza ha permesso una accurata caratterizzazione e modulazione della sua azione, sia in sistemi cellulari che *in vivo*.

In tempi più recenti è stato possibile sintetizzare con tecniche di ingegneria genetica il NGF umano (Iwane, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 171:116, **1990**), e sono anche divenute reperibili commercialmente piccole quantità di NGF umano. Tuttavia, da esperienze dirette si è riscontrato che l'attività biologica del NGF umano è molto bassa rispetto all'attività del NGF murino. Inoltre, è da tenere presente che la quasi totalità dei dati sull'uomo attualmente disponibili, sia *in vitro* che *in vivo*, sono stati ottenuti utilizzando il NGF murino, e che non sono mai stati riscontrati effetti indesiderati ricollegabili all'origine murina della molecola.

Con riferimento ad un possibile coinvolgimento del nerve growth factor in disordini pigmentari della pelle, è stato ipotizzato da lungo tempo, come sopra notato, che l'NGF possa prendere parte nella citata infiammazione neurogenica, che a sua volta è coinvolta nella patogenesi di diverse malattie cutanee (Pincelli C., Eur. J. Dermatol., **2000**). Partendo da tale ipotesi, alcuni rapporti scientifici pubblicati nel campo dermatologico specialistico si riferiscono ad un possibile uso di antagonisti del NGF nel trattamento di patologie ipopigmentarie della pelle (El-Samad ZA. et al., Egypt. J. Derm. & Androl. Vol. 27, No. 3,4, **2006**; Lee MH. et al., Korean J. Physiol. Pharmacol., **2002**). In particolare, è stato rilevato che la terapia

PUVA riduce la densità cutanea delle terminazioni nervose (Tominaga M. et al., J Dermatol. Sci., **2009**), mentre è noto che l'applicazione topica di NGF produrrebbe un effetto opposto.

In linea con la proposta degli autori citati di utilizzare un antagonista di NGF nel trattamento della vitiligine, altri studi hanno suggerito che una terapia mirata a ridurre i livelli cutanei di NGF potrebbe essere benefica per le lesioni cutanee ipopigmentarie della vitiligine (Rateb A. et al., J. Egypt. Wom Dermatol. Soc., **2004**). In questo studio viene suggerito che nelle chiazze di cute ipopigmentata si ha un'aumentata espressione di NGF, e che l'attivazione dei recettori di NGF sui melanociti è critica per la loro degenerazione/distruzione nella vitiligine e che pertanto, in teoria, un antagonista dell'NGF potrebbe rappresentare una futura terapia per la vitiligine.

Per la terapia della vitiligine è stato anche proposto l'uso una famiglia di molecole biologicamente attive di origine naturale nota come fattore di crescita fibroblastico (fibroblast growth factor, FGF), in particolare il fattore di crescita fibroblastico basico (bFGF), e di sequenze polipeptidiche da esso derivate. In particolare, nel brevetto **US 6143723** e nelle domande di brevetto **EP-A-1754489** e **US 2007/0027080** (tutti a nome Abburi, Ramaiah) viene proposto l'uso di preparati contenenti sequenze parziali di bFGF per applicazione topica cutanea per la terapia della vitiligine, sia da solo che in associazione con le altre terapie già note per il trattamento della vitiligine.

Recentemente, la domanda di brevetto **US 2010/0222275**, (Tamaki et al.) ha proposto un preparato topico per la terapia della vitiligine a base di un agente avente un'attività di ispessimento dell'epidermide, e ha elencato come agenti aventi una tale attività quelli appartenenti al gruppo dei fattori di crescita fibroblastici (FGF), sia acido (aFGF) che basico (bFGF), il fattore di crescita epidermico (epidermal growth factor, EGF), il fattore di crescita vascolare endoteliale (vascular endothelial growth factor, VEGF)

e il fattore di crescita di derivazione piastrinica (platelet-derived growth factor, PDGF).

Sommario dell'invenzione

La presente invenzione si propone lo scopo di fornire un preparato topico dermatologico da applicare sulla pelle sana come agente autoabbronzante o sulla pelle depigmentata in pazienti affetti da vitiligine e/o altre patologie cutanee ipopigmentarie, per la terapia e/o la profilassi di tali patologie.

Secondo l'invenzione è stato trovato, contrariamente a quanto suggerito dalla letteratura citata in precedenza, che la somministrazione topica sulla cute di preparati a base di nerve growth factor (NGF) è efficace nel conseguire un'intensificazione del colorito, ovvero un aumento della pigmentazione nel caso di cute sana e non affetta da discromatosi, e un miglioramento delle patologie dermatologiche che si manifestano con acromia o ipocromia cutanea, come è il caso della vitiligine.

È stata infatti sorprendentemente osservata, in sei pazienti volontari (tre uomini e tre donne) affetti da vitiligine su aree cutanee multiple e discrete, una ripigmentazione delle aree depigmentate in seguito ad un trattamento di 2-8 settimane con un preparato di crema topica base contenente da 50 a 500 µg/ml di NGF murino, applicata 2-4 volte al giorno.

In questi pazienti è stato anche osservato, dopo il trattamento, un aumento della sensibilità al contatto nelle chiazze con vitiligine, rilevando per mezzo di un estesiometro a contatto Cochet-Bonnet la differenza di sensibilità cutanea tra due punti, di cui uno all'interno della chiazza depigmentata e l'altro sulla cute sana circostante.

Il possibile meccanismo d'azione del trattamento proposto secondo l'invenzione è stato preliminarmente studiato *in vitro* su colture cellulari primarie di melanociti epidermici umani normali, e *in vivo* su cavie trattate con il preparato di NGF in confronto con il veicolo (crema base) applicato

da solo (placebo). È risultato che l'aggiunta di NGF causava un aumento del contenuto di melanina e aumentava la vitalità cellulare e la diffusione dei melanociti in seguito a irraggiamento con luce UV.

Ancora più notevolmente, si è osservato un aumento della pigmentazione cutanea delle cavie sottoposte all'esperimento e trattate con NGF, anche in assenza di esposizione alla luce UV o ai raggi solari per l'intero periodo dell'esperimento, suggerendo con ciò per il prodotto a base di NGF una potenziale utilizzabilità come preparato abbronzante o anche autoabbronzante.

Dopo il trattamento, gli animali sono stati sacrificati, e gli esami istologici hanno rivelato un aumento dei melanociti, del contenuto di melanina e delle terminazioni nervose nella pelle che aveva subito il trattamento con NGF.

Inoltre, sempre nell'ambito degli studi connessi con la presente invenzione, è stata studiata la presenza di NGF e dei suoi recettori nel derma e nell'epidermide, sia negli esperimenti *in vitro* e *in vivo* sopra menzionati che in tessuti ottenuti da biopsie umane. È stato osservato che sia l'NGF che i suoi recettori ad alta affinità (TrkA) e a bassa affinità (p75) sono localizzati sia sui cheratinociti che sui melanociti e sui fibroblasti, in accordo con la letteratura precedente già citata.

La presenza del NGF e dei suoi recettori nella cute normale sana, che è stata verificata per mezzo di tecniche immunoistochimiche e molecolari, rappresenta un prerequisito fondamentale perché si possa manifestare la sua attività biologica, e quindi anche un effetto terapeutico. A tale proposito è da notare che in due biopsie di tessuti prelevati da chiazze acromiche in soggetti volontari affetti da vitiligine e non trattati, esaminate con tecniche immunoistochimiche, non è stata rilevata la presenza di NGF.

Secondo la presente invenzione, e contrariamente a quanto suggerito dalla letteratura citata in precedenza, si ipotizza che nelle patologie

ipopigmentarie del tipo della vitiligine una riduzione dei livelli locali di NGF al di sotto della soglia minima in grado di assicurare l'integrità dei tessuti possa rappresentare un meccanismo patogenetico, e che gli effetti positivi di una somministrazione di NGF esogeno ai tessuti interessati possano comparire già a concentrazioni di NGF dell'ordine di quelle fisiologiche (alcuni microgrammi/ml).

La presente invenzione fornisce pertanto un prodotto per applicazione topica in grado di aumentare la pigmentazione epidermica a scopo di abbronzatura o scurimento della pelle, nonché per il trattamento della vitiligine e altre patologie cutanee ipopigmentarie. Il prodotto è da applicare localmente allo scopo di favorire o accelerare la pigmentazione o ripigmentazione, aumentando l'innervazione sensoria cutanea e stimolando i melanociti.

La possibilità che il nerve growth factor manifestasse un'azione biologica in seguito a somministrazione topica sulla superficie cutanea era difficilmente prevedibile, soprattutto in considerazione del fatto che, come sopra evidenziato, il NGF è una molecola di notevoli dimensioni (26.800 dalton) con una struttura complessa. Affinché una molecola possa agire a livello dei tessuti cutanei più profondi è necessario che una volta applicata sulla superficie cutanea essa penetri attraverso lo strato corneo. Nella pratica corrente sono già noti principi attivi per applicazione topica cutanea (in particolare, steroidi come il cortisone), in grado di penetrare attraverso l'epidermide e di raggiungere gli strati più profondi a concentrazioni terapeuticamente efficaci, ma le loro dimensioni molecolari sono notevolmente inferiori alle dimensioni del NFG. In effetti l'NGF, sebbene abbia una complessa struttura e un notevole peso molecolare, comprende sia gruppi idrofili che gruppi lipofili, cosa che permette alla molecola di passare attraverso le barriere anatomiche omologhe (idrofile e lipofile).

Inoltre, una caratteristica fondamentale dell'NGF consiste nel fatto che una volta che esso ha raggiunto i tessuti bersaglio in concentrazioni

anche minime, ma biologicamente attive, è in grado di stimolare una produzione endogena, da parte del tessuto, dello stesso NGF.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un preparato topico cutaneo a base di nerve growth factor (NGF) per indurre, intensificare o accelerare la pigmentazione cutanea in soggetti dermatologicamente sani e per la terapia e/o la profilassi di patologie dermatologiche accompagnate da discromie cutanee.

In modo specifico, il preparato proposto secondo l'invenzione contiene come principio attivo una quantità efficace della neurotrofina denominata nerve growth factor (NGF) in un veicolo farmaceuticamente o cosmeticamente accettabile, dermatologicamente tollerato e compatibile con il principio attivo stesso. Altre molecole biologicamente attive appartenenti, come il nerve growth factor, alla famiglia delle neurotrofine, e specificamente la neurotrofina-3 (NT-3), la neurotrofina-4 (NT-4) e il fattore neurotrofico cerebrale (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) possono rappresentare validi candidati per lo stesso uso terapeutico o cosmetico secondo l'invenzione.

Secondo un primo aspetto dell'invenzione, il preparato topico a base di NGF proposto può essere applicato sulla superficie cutanea di soggetti dermatologicamente sani, cioè non affetti da patologie cutanee, al semplice scopo di scurire la carnagione e fornire un effetto di abbronzatura equivalente a quello ottenibile con l'esposizione all'irraggiamento solare. Pertanto, il prodotto a base di NGF può essere utilizzato come principio attivo, da solo o in associazione con altri principi attivi noti nel settore, sia in formulazioni cosmetiche autoabbronzanti, sia come additivo in preparati solari convenzionali per intensificare l'abbronzatura naturale o per prolungarne la durata.

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, come già evidenziato,

detto preparato topico è adatto per la terapia e/o la profilassi di patologie cutanee depigmentarie e/o ipopigmentarie, in modo specifico patologie su base trofica, neurotrofica, post-traumatica, post-infettiva, post-chirurgica, autoimmune, genetica, metabolica, nutrizionale, endocrina, chimica, fisica, distrofica, degenerativa o post-infiammatoria. In modo specifico, tra le patologie cutanee che possono avvalersi del trattamento con NGF proposto vi sono quelle elencate nel seguente gruppo consistente in: vitiligine, vitiligine bilaterale, vitiligine acrofaciale, vitiligine generalizzata, vitiligine focali, vitiligine segmentale, vitiligine universale, vitiligine perinevica o nevi di Sutton, leucodermia, discromia cutanea, piebaldismo, pitiriasi alba, pitiriasi versicolor, ipomelanosì guttata idiopatica e post-infiammatoria, nevi acromici o depigmentati, ipomelanosì maculata progressiva, ipomelanosì causate da disturbi metabolici, nutrizionali o endocrini, ipomelanosì causate da agenti chimici, fisici o farmacologici, ipomelanosì infettive e post-infettive, ipomelanosì infiammatorie.

È da considerare che molte di queste patologie sono difficili da trattare, o mancano del tutto di una terapia efficace. Altri disordini che si manifestano con acromie o ipocromie cutanee, o degli annessi cutanei, e che potrebbero essere trattati, almeno per quanto riguarda l'aspetto dermatologico, con un preparato a base di NGF secondo l'invenzione sono: albinismo, disordini albinoidi, canizie, incontinenza pigmenti, ipomelanosì di Ito, mosaicismismo pigmentario, lichen sclero-atrofico, melanoleucodermia, malattia di Chédiak-Higashi, sindrome di Rozycki, ipomelanosì di Waardenburg, sindrome di Fisch, sclerosi tuberosa di Bourneville, ipomelanosì di Ziprkowski-Margolis, sindrome di Menkès, sindrome di Westerhof, sindrome di Vogt-Koyanagi-Harada, sindrome di Alezzandrini, poikiloderma sclerosante ereditario, acropigmentazione di Dohi.

In maniera specifica, l'invenzione riguarda l'uso della neurotrofina denominata nerve growth factor (NGF) in forma di in forma di soluzione o sospensione acquosa, oleosa o alcolica, di emulsione, spray, lozione, li-

nimento, crema, pomata o gel, contenente NGF come principio attivo in un veicolo farmaceuticamente accettabile. È anche possibile prevedere particolari vie di somministrazione oltre all'applicazione cutanea, ad esempio tramite meccanismi di iontoforesi, o in forma di sistema "reservoir" a membrana (ad esempio una membrana polimerica) da applicare sull'epidermide, o in una forma adatta per il rilascio percutaneo, transcutaneo o sottocutaneo, contenente NGF come principio attivo in un veicolo farmaceuticamente accettabile. Come ulteriore alternativa, il NGF, o un preparato che lo contiene, può essere aggiunto ad un bendaggio locale da applicare sulle zone cutanee depigmentate.

Allo scopo di realizzare il preparato secondo l'invenzione, le procedure adatte per l'estrazione e la purificazione dell'NGF sono riportate nei riferimenti di letteratura già citati. La tecnica secondo Bocchini e Angeletti, qui di seguito brevemente riportata, è stata usata per la produzione del prodotto in studio. Vengono prelevate sterilmente le ghiandole sottomandibolari di topi maschi adulti, e i tessuti vengono omogeneizzati, centrifugati e dializzati; quindi la sospensione viene fatta passare attraverso successive colonne di cellulosa, su cui rimane assorbito il NGF. Il NGF viene quindi eluito dalla colonna mediante un tampone contenente cloruro di sodio 0,4 M. I campioni così ottenuti vengono letti allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 280 nm per identificare le frazioni contenenti NGF. Queste ultime vengono dializzate ed il NGF così ottenuto viene liofilizzato sterilmente e conservato in freezer a -20 °C.

Un prodotto medicinale secondo l'invenzione adatto per somministrazione sulla superficie cutanea può contenere di preferenza, da solo o in associazione con uno o più altri principi attivi, da 1 a 1000 µg/ml di NGF, e ancor più preferibilmente da 10 a 500 µg/ml di NGF.

Come già notato, nel preparato topico secondo l'invenzione il NGF può anche essere presente in associazione con uno o più altri principi attivi indicati per la terapia e/o la profilassi della patologia dermatologica trat-

tata, oppure può essere coniugato con una molecola carrier.

Una formulazione specifica adatta per applicazione cutanea può essere costituita, ad esempio, da NGF murino purificato liofilizzato, risospeso in soluzione fisiologica allo 0,9 % di cloruro di sodio, oppure in soluzione salina bilanciata (BSS) e infine miscelata con un preparato di crema base o di unguento base in modo da ottenere una miscela finale con 200 µg/ml di NGF per applicazione topica cutanea.

Altri esempi non limitativi di formulazione a base di NGF comprendono formulazioni in spray, unguento, gel, crema o linimento e comprendono adatti veicoli come glicol polietilenico o polietilenossido, poliacrilato, carbossimetilcellulosa, acidi e alcoli grassi, lanolina, cetomacrogol, paraffina e prodotti analoghi.

La soluzione, sospensione o emulsione a base di NGF secondo l'invenzione può contenere vari altri componenti biologicamente attivi, e/o il NGF può essere coniugato con molecole carrier o con molecole note per facilitare la permeazione attraverso l'epidermide, o con veicoli cosmeticamente accettabili (ovvero adatti per uso cosmetico), e può contenere altri componenti opzionali noti nel settore e scelti tra quelli convenzionalmente utilizzati nella tecnica farmaceutica e cosmetica, come agenti acidificanti, agenti alcalinizzanti, conservanti e antimicrobici, antiossidanti, tamponi, agenti chelanti, disperdenti, emollienti, umettanti, fragranze, agenti di filtro solare, nonché altri agenti dermatologicamente attivi. Esempi non limitativi di tali categorie di eccipienti e coadiuvanti di formulazione sono elencati di seguito.

Esempi di agenti acidificanti che possono essere aggiunti per ottenere il pH desiderato comprendono acido citrico, acido lattico, acido glicolico, acido acetico, acido malico e acido propionico, mentre esempi di agenti alcalinizzanti comprendono edetol, potassio carbonato, idrossidi di potassio o di sodio, sodio borato, sodio carbonato, sodio citrato, sodio lattato, sodio glicolato.

Agenti antimicrobici e conservanti possono essere usati quando i prodotti da applicare sulla pelle sono soggetti all'infezione microbica e/o per proteggere il prodotto dalla degradazione. Esempi di conservanti adatti comprendono fenossietanolo, metilparaben, etilparaben, propilparaben, butilaraben, cloruro di benzalconio, cloruro di benzetonio, clorobutanolo, acido benzoico, sodio benzoato, alcool benzilico, acetato fenilmercurico, potassio sorbato, acido sorbico e loro miscele, come l'olio LiquaPar®.

Per proteggere gli ingredienti del prodotto da sostanze ossidanti che siano incluse nella formulazione o vengano in contatto con essa nell'uso o nella conservazione possono essere usati agenti antiossidanti. Esempi di agenti adatti comprendono antiossidanti idrosolubili come acido ascorbico, sodio bisolfito o metabisolfito, formaldeide solfossilato di sodio, acido ascorbico, acido isoascorbico, cisteina cloridrato, 1,4-diazabicciclo-(2,2,2)-ottano e loro miscele. Esempi di antiossidanti liposolubili comprendono ascorbil-palmitato, idrossianisolo butilato, idrossitoluene butilato, propilgallato, ottilgallato e dodecilgallato di potassio, fenil-alfa-naftilammina e tocoferoli come alfa-tocoferolo.

Allo scopo di promuovere la penetrazione del prodotto attraverso l'epidermide, possono essere aggiunti altri eccipienti scelti tra quelli convenzionalmente usati nella tecnica farmaceutica, ad esempio per tamponare la soluzione, sospensione o emulsione, per stabilizzare il principio attivo e/o per rendere più tollerabile il preparato. Adatti tamponi dovrebbero mantenere il pH tra 4 e 8. Esempi di tamponi adatti per uso cutaneo comprendono calcio acetato, potassio metafosfato, potassio fosfato monobasico e acido tartarico.

Esempi di agenti chelanti che possono essere utilizzati per mantenere la forza ionica del prodotto e/o legarsi a composti distruttivi e a metalli che siano compresi o vengano in contatto con il prodotto includono acido etilendiammino-tetraacetico (EDTA) e suoi sali, come dipotassio edetato, disodio edetato e tetrasodio EDTA.

Esempi di agenti disperdenti adatti per le formulazioni topiche cutanee a base di NGF dell'invenzione comprendono carrageenani, silicato di magnesio e alluminio, gomma xantano e biossido di silicio.

Gli emollienti sono agenti che ammorbidiscono e rendono liscia l'epidermide, e possono quindi facilitare il passaggio del prodotto attraverso lo strato corneo. La biodisponibilità cutanea del NGF può essere ulteriormente aumentata utilizzando composti che favoriscono la permeazione del principio attivo, come ad esempio dimetilsolfossido, taurocolati, fosfolipidi di membrana e vari agenti tensioattivi adatti per uso dermatologico. Esempi di emollienti includono oli e cera come cera microcristallina, esteri trigliceridi come olio di ricino, olio di cartamo, olio di mais, olio d'oliva, olio di fegato di merluzzo, olio di mandorle, olio di palma, olio di sè, burro di cacao, squalene, monogliceridi acetilati, gliceridi etossilati, acidi grassi, esteri alchilici di acidi grassi, esteri alchenilici di acidi grassi, alcoli grassi, eteri di alcoli grassi, lanolina e suoi derivati, esteri di alcoli poliossidrilici, esteri di cere come la cera d'api, cere vegetali, isopropil-palmitato e gliceril-stearato.

Gli umettanti sono agenti che tipicamente promuovono la ritenzione dell'umidità, ad esempio gli agenti idratanti. Esempi di umettanti comprendono silossani, sorbitolo, glicerina, glicereth-5-lattato, glicereth-7-triacetato, glicereth-7-diisononanoato, esantriolo, glicoli come metilpropandiol, 1,2-pentandiolo, esilenglicol e propilenglicol, glucosio alcossilato, D-pantenolo e suoi derivati, acido ialuronico.

Esempi di profumi che possono essere aggiunti al prodotto topico cutaneo secondo l'invenzione sono menta piperita, olio di rose, acqua di rose, aloe vera, olio di garofano, mentolo, canfora, olio di eucalipto e altri estratti vegetali. Per eliminare certi odori dal prodotto possono essere usati agenti mascheranti, ad esempio etilene brassilato.

Agenti di filtro solare sono agenti tipicamente impiegati per bloccare o ridurre la quantità di radiazione ultravioletta che colpisce la cute, (ad es.,

per assorbimento, per diffusione o per riflessione della radiazione ultravioletta). Numerosissimi esempi di filtri solari sono noti in letteratura, e tra questi, ad esempio, sia composti organici e i loro sali, come butilmetossitobenzoilmetano, dietilesil-butammido-triazone, dietilammino-idrossibenzoil-esilbenzoato, etilesiltriazone, bis-etilesilossifenol-metossifeniltriazina, metilen-bis-benzotriazolil-tetrametilbutilfenolo, acido fenil-benzimidazolsolfonico, etilesilsalicilato, benzofenone-3, ottocrilene, avobenzene, mentil-antranilato e 2-etilesil-p-metossicinnamato, come pure materiali particolati inorganici, come ossido di zinco, silice, ossido di ferro, diossido di titanio. In generale, il prodotto può contenere dallo 0% al 50% in peso di agenti di filtro solare. Le quantità esatte varieranno a seconda del filtro usato e del fattore di protezione solare (SPF) desiderato.

Agenti dermatologicamente attivi che possono essere aggiunti al prodotto a base di NGF secondo l'invenzione comprendono gli agenti già menzionati per il trattamento delle ipocromie o acromie della pelle, e della vitiligine in particolare, come pure gli agenti approvati per il trattamento di altre condizioni dermatologiche che possano essere associate o debbano essere prevenute nel corso di un trattamento abbronzante, come l'acido retinoico.

Secondo un suo ulteriore aspetto, la presente invenzione ha ad oggetto un metodo per indurre o intensificare la pigmentazione cutanea mediante l'applicazione sulla pelle di un preparato a base di nerve growth factor (NGF), preferibilmente contenente da 1 a 1000 µg/ml di NGF. Tale metodo consente di stimolare e/o accelerare la pigmentazione cutanea sia a scopo puramente estetico sia nel trattamento di patologie cutanee ipopigmentarie come la vitiligine.

Nel caso dell'uso del preparato in un metodo di trattamento abbronzante, come già notato, il prodotto topico a base di NFG può essere formulato assieme con un preparato autoabbronzante o usato contemporaneamente ad esso, può essere combinato con un preparato abbronzante

solare, e l'applicazione di detto preparato può essere associata con esposizione ad irraggiamento UV o ad irraggiamento solare.

Nel caso di uso del preparato dell'invenzione a scopo terapeutico, si è potuto verificare sperimentalmente, secondo l'invenzione, che l'applicazione topica di nerve growth factor sulla cute depigmentata aumenta l'innervazione cutanea, esercitando un'azione neurotrofica sul tessuto depigmentato o ipopigmentato. Tale effetto consegue il risultato di stimolare i melanociti cutanei, e pertanto consente di ottenere una ripigmentazione delle zone affette da una riduzione patologica della pigmentazione.

Pertanto, secondo alcune forme di realizzazione preferite dell'invenzione, nel metodo proposto per la terapia e/o profilassi di patologie dermatologiche accompagnate da discromie cutanee secondo l'invenzione, l'applicazione del preparato a base di NGF è preferibilmente associata con uno o più dei seguenti:

- (i) applicazione di un preparato steroideo per uso topico;
- (ii) applicazione di un preparato per uso topico a base di vitamina D attivata e/o di vitamina D₃ attivata;
- (iii) fototerapia da sola o associata con l'uso di agenti fotosensibilizzanti, in particolare psoraleni.

Come già notato, le dette patologie dermatologiche trattate sono scelte dal gruppo consistente in: vitiligine, vitiligine bilaterale, vitiligine acrofaciale, vitiligine generalizzata, vitiligine focale, vitiligine segmentale, vitiligine universale, vitiligine perinevica o nevi di Sutton, leucodermia, discromia cutanea, piebaldismo, pitiriasi alba, pitiriasi versicolor, ipomelanosi guttata idiopatica e post-infiammatoria, nevi acromici o depigmentati, ipomelanosi maculata progressiva, ipomelanosi causate da disturbi metabolici, nutrizionali o endocrini, ipomelanosi causate da agenti chimici, fisici o farmacologici, ipomelanosi infettive e post-infettive, ipomelanosi infiammatorie.

ESEMPI

Alcune forme di realizzazione specifiche del trattamento secondo l'invenzione vengono descritte in seguito a titolo meramente esemplificativo ma non limitativo, assieme ai risultati delle sperimentazioni cliniche effettuate.

ESEMPIO 1

Esperimento *in vitro*

Colture cellulari primarie di melanociti umani normali sono state seminate in piastre di Petri e poste in coltura per una settimana secondo i protocolli standard con e senza la presenza di NGF nel mezzo di coltura. Il contenuto di melanina misurato con test immunoenzimatico ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) era significativamente aumentato nelle colture arricchite con NGF. La proliferazione e la diffusione dei melanociti non era significativamente differente. Tuttavia, una diffusione dei melanociti significativamente più rapida e un ridotto numero di cellule apoptotiche è stato osservato quando le colture cellulari arricchite di NGF sono state irraggiate con luce ultravioletta.

ESEMPIO 2

Esperimento *in vivo*

Cavie pigmentate di quattro settimane di età che erano state precedentemente acclimatate per una settimana sono state rasate due volte alla settimana nella parte dorsale, con un rasoio elettrico, in una zona di circa 6cm x 6cm. La somministrazione veniva effettuata in due siti della zona rasata distanzianti da una parte e dall'altra della linea mediana: sulla parte sinistra veniva applicato un preparato topico contenente 200 µg/ml di NGF murino in un veicolo di crema base, mentre sulla parte destra veniva applicata la crema base da sola.

L'applicazione è stata effettuata uniformemente due volte al giorno per 6 settimane, nella parte centrale della zona rasata, di circa 2cmx2cm. A partire al secondo giorno e successivamente, i siti di applicazione sono

stati detersi strofinando la cute prima di applicare i preparati in prova. Si è posta attenzione per evitare qualsiasi esposizione degli animali a luce ultravioletta. Il colore della pelle è stato misurato per mezzo di un colorimetro prima della prima applicazione (tempo zero) e dopo la fine del trattamento.

Il colorito dei lati trattati con NGF è aumentato significativamente rispetto al tempo zero in tutti gli animali trattati, quando confrontato con il colorito della zona trattata con il solo veicolo.

Dopo il trattamento, gli animali sono stati sacrificati e campioni di cute sono stati prelevati sia dalla zona trattata che da quella non trattata, di ciascun animale, per ulteriori esami istologici. Sia i melanociti che il contenuto di melanina e la densità delle terminazioni nervose erano aumentate significativamente nelle aree di pelle trattate con il preparato a base di NGF rispetto alle aree trattate con il solo veicolo.

ESEMPIO 3.

Trattamento di pazienti con vitiligine

Un trattamento topico con un preparato contenente 50 µg/ml di NGF murino in crema base è stato applicato 4 volte al giorno per 8 settimane in due pazienti volontari (un uomo e una donna) affetti da vitiligine, su una chiazza di superficie cutanea depigmentata

In ciascun soggetto il colorito della chiazza di pelle sottoposta al trattamento è stato misurato con un colorimetro prima e dopo il trattamento stesso, ed è stato confrontato con il colorito di pelle sana pigmentata in una vicina zona cutanea dello stesso paziente, nonché con il colorito della chiazza trattata dopo il trattamento.

La sensibilità al contatto è stata misurata per mezzo di un estesiometro a contatto Cochet-Bonnet, e valutando la differenza tra sensibilità cutanea in due punti, nella chiazza depigmentata e in una zona di pelle sana nelle vicinanze, utilizzando un compasso calibrato.

Un miglioramento significativo del colorito nella chiazza è stato os-

servato alla fine del trattamento, in confronto sia con la chiazza di cute affetta dalla discromia sia con la zona di cute sana degli stessi pazienti. È stato anche osservato, alla fine del trattamento, un miglioramento significativo della sensibilità cutanea al contatto, con un miglioramento medio di 5 mm come misurato dall'estesiometria Cochet-Bonnet e di 3 mm come misurato dalla differenza di sensibilità cutanea tra due punti.

Non è stato riportato dai pazienti alcun effetto collaterale, locale o sistemico.

ESEMPIO 4.

Trattamento di pazienti con vitiligine

Un trattamento topico con un preparato contenente 200 µg/ml di NGF murino in un veicolo di crema base è stato applicato 3 volte al giorno per 4 settimane in due pazienti volontari (un uomo e una donna) affetti da vitiligine, su una chiazza di superficie cutanea depigmentata.

Le valutazioni dei risultati e le relative modalità erano le stesse dell'Esempio 3.

Alla fine del trattamento è stato osservato un significativo miglioramento nella pigmentazione delle chiazze affette da vitiligine, sia nel confronto con le stesse chiazze prima del trattamento che nel confronto con zone di cute non affette da vitiligine degli stessi pazienti. È stato anche osservato un miglioramento significativo della sensibilità cutanea al contatto, con un miglioramento medio di 8 mm come misurato dall'estesiometria Cochet-Bonnet e di 5 mm come misurato dalla differenza di sensibilità cutanea tra due punti.

Non è stato riportato dai pazienti alcun effetto collaterale, locale o sistemico.

ESEMPIO 5

Trattamento di pazienti con vitiligine

Un trattamento topico con un preparato contenente 500 µg/ml di NGF murino in crema base è stato somministrato 2 volte al giorno per 2

settimane a due pazienti con vitiligine (un uomo e una donna).

Le valutazioni dei risultati e le relative modalità erano le stesse dell'Esempio 3.

Alla fine del trattamento è stato osservato un significativo miglioramento nella pigmentazione delle chiazze affette da vitiligine, sia nel confronto con le stesse chiazze prima del trattamento che nel confronto con zone di cute non affette da vitiligine degli stessi pazienti. È stato anche osservato un miglioramento significativo della sensibilità cutanea al contatto, con un miglioramento medio di 1cm come misurato dall'estesiometria Cochet-Bonnet e di 5 mm come misurato dalla differenza di sensibilità cutanea tra due punti.

Non è stato riportato dai pazienti alcun effetto collaterale, locale o sistemico.

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche, ma è da intendersi che variazioni o modifiche potranno essere ad essa apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Preparato topico cutaneo a base di nerve growth factor (NGF) per indurre, intensificare o accelerare la pigmentazione cutanea in soggetti dermatologicamente sani e per la terapia e/o la profilassi di patologie dermatologiche accompagnate da discromie cutanee.

2. Preparato topico secondo la rivendicazione 1, per l'uso come ingrediente attivo in formulazioni autoabbronzanti o in preparati solari.

3. Preparato topico secondo la rivendicazione 1, in cui dette patologie dermatologiche accompagnate da discromie cutanee sono patologie su base trofica, neurotrofica, post-traumatica, post-infettiva, post-chirurgica, autoimmune, genetica, metabolica, nutrizionale, endocrina, chimica, fisica, distrofica, degenerativa o post-infiammatoria.

4. Preparato topico secondo la rivendicazione 3, cui dette patologie dermatologiche sono scelte dal gruppo consistente in: vitiligine, vitiligine bilaterale, vitiligine acrofaciale, vitiligine generalizzata, vitiligine focale, vitiligine segmentale, vitiligine universale, vitiligine perinevica o nevi di Sutton, leucodermia, discromia cutanea, piebaldismo, pitiriasi alba, pitiriasi versicolor, ipomelanosì guttata idiopatica e post-infiammatoria, nevi acromici o depigmentati, ipomelanosì maculata progressiva, ipomelanosì causate da disturbi metabolici, nutrizionali o endocrini, ipomelanosì causate da agenti chimici, fisici o farmacologici, ipomelanosì infettive e post-infettive, ipomelanosì infiammatorie.

5. Preparato topico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-3, in forma di soluzione o sospensione acquosa, oleosa o alcolica, di emulsione, spray, lozione, linimento, crema, pomata, liposomi o gel, contenente NGF come principio attivo in un veicolo farmaceuticamente accettabile, o in forma di sistema "reservoir" a membrana da applicare sull'epidermide, o in una forma adatta per il rilascio percutaneo, transcutaneo o sottocutaneo, contenente NGF come principio attivo in un veicolo farmaceutica-

mente accettabile.

6. Preparato topico secondo la rivendicazione 5, contenente da 1 a 1000 µg/ml di NGF.

7. Preparato topico secondo la rivendicazione 6, contenente da 10 a 500 µg/ml di NGF.

8. Preparato topico secondo le rivendicazioni 3 o 4, in cui il NGF è in associazione con uno o più altri principi attivi indicati per la terapia e/o la profilassi della patologia dermatologica trattata o è coniugato con una molecola carrier.

9. Metodo per indurre o intensificare la pigmentazione cutanea mediante l'applicazione sulla pelle di un preparato a base di nerve growth factor (NGF).

10. Metodo secondo la rivendicazione 9 in cui l'applicazione di detto preparato è associata con esposizione ad irraggiamento UV o ad irraggiamento solare.

11. Metodo secondo la rivendicazione 9 in cui detto preparato è associato con un preparato autoabbronzante o con un preparato abbronzante solare.

12. Metodo secondo la rivendicazione 9 nella terapia e/o profilassi di patologie dermatologiche accompagnate da discromie cutanee, in cui l'applicazione di detto preparato è associata con uno o più dei seguenti:

- (i) applicazione di un preparato steroideo per uso topico;
- (ii) applicazione di un preparato per uso topico a base di vitamina D attivata e/o di vitamina D₃ attivata;
- (iii) fototerapia da sola o associata con l'uso di agenti fotosensibilizzanti, in particolare psoraleni.

13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui dette patologie dermatologiche sono scelte dal gruppo consistente in: vitiligine, vitiligine bilaterale, vitiligine acrofaciale, vitiligine generalizzata, vitiligine focale, vitiligine segmentale, vitiligine universale, vitiligine perinevica o nevi di Sut-

ton, leucodermia, discromia cutanea, piebaldismo, pitiriasi alba, pitiriasi versicolor, ipomelanosì guttata idiopatica e post-infiammatoria, nevi acromici o depigmentati, ipomelanosì maculata progressiva, ipomelanosì causate da disturbi metabolici, nutrizionali o endocrini, ipomelanosì causate da agenti chimici, fisici o farmacologici, ipomelanosì infettive e post-infettive, ipomelanosì infiammatorie.

14. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 9-13, in cui detto preparato a base di NGF contiene da 1 a 1000 µg/ml di NGF.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

CLAIMS

1. A topical cutaneous preparation based on nerve growth factor (NGF) for inducing, intensifying or accelerating the skin pigmentation in dermatologically healthy subjects and for the therapy and/or the prophylaxis of dermatological disorders accompanied by skin dyschromias.

2. A topical preparation according to claim 1, for use as an active ingredient in self-tanning compositions or in sunscreen compositions.

3. A topical preparation according to claim 1, wherein the said dermatological disorders accompanied by skin dyschromias are disorders of trophic, neurotrophic, post-traumatic, post-infective, post-surgical, autoimmune, genetic, metabolic, nutritional, endocrine, chemical, physical, dystrophic, degenerative or post-inflammatory origin.

4. A topical preparation according to claim 3, wherein the said dermatological disorders are selected from the group consisting of: vitiligo, bilateral vitiligo, acrofacial vitiligo, generalized vitiligo, focal vitiligo, segmental vitiligo, universal vitiligo, perinevic vitiligo or Sutton nevus, leucoderma, cutaneous dyschromia, piebaldism, pityriasis alba, pityriasis versicolor, idiopathic and post-inflammatory guttate hypomelanosis, achromic or depigmented nevi, progressive macular hypomelanosis, hypomelanoses caused by metabolic or nutritional or endocrine disorders, hypomelanoses caused by chemical, physical or pharmacologic agents, infective and post-infective hypomelanoses, inflammatory hypomelanosis.

5. A topical preparation according to any one of claims 1-3, in the form of an aqueous, oily or alcoholic solution or suspension, an emulsion, spray, lotion, liniment, cream, ointment, or gel, containing NGF as active ingredient in a pharmaceutically acceptable carrier, or in the form of a membrane "reservoir" system to be placed on the epidermis, or in a form suitable for intradermal, transdermal or subcutaneous administration, containing NGF as active ingredient in a pharmaceutically acceptable carrier.

6. A topical preparation according to claim 5, containing from 1 to 1000 µg/ml of NGF.

7. A topical preparation according to claim 6, containing from 10 to 500 µg/ml of NGF.

8. A topical preparation according to claims 3 or 4, wherein the NGF is in combination with one or more other active ingredients indicated for the therapy and/or the prophylaxis of the dermatological disorder to be treated, or it is conjugated with a carrier molecule.

9. A method for inducing, intensifying or accelerating the skin pigmentation by applying on the skin a preparation based on nerve growth factor (NGF).

10. A method according to claim 9, wherein the application of said preparation is combined with exposure to UV radiation or to solar radiation.

11. A method according to claim 9, wherein the said preparation is combined with a self-tanning preparation or with a solar tanning preparation.

12. A method according to claim 9, for the therapy and/or the prophylaxis of dermatological disorders accompanied by skin dyschromias, wherein the administration of the said preparation is combined with one or more of the following:

- (i) administration of a topical steroid preparation;
- (ii) administration of a topical preparation based on activated vitamin D and/or activated vitamin D₃;
- (iii) phototherapy alone or combined with the use of photosensitizing agents, in particular psoralenes.

13. A method according to claim 12, wherein the said dermatological disorders are selected from the group consisting of: vitiligo, bilateral vitiligo, acrofacial vitiligo, generalized vitiligo, focal vitiligo, segmental vitiligo, universal vitiligo, perinevic vitiligo or Sutton nevus, leucoderma, cutaneous

dyschromia, piebaldism, pityriasis alba, pityriasis versicolor, idiopathic and post-inflammatory guttate hypomelanosis, achromic or depigmented nevi, progressive macular hypomelanosis, hypomelanoses caused by metabolic or nutritional or endocrine disorders, hypomelanoses caused by chemical, physical or pharmacologic agents, infective and post-infective hypomelanoses, inflammatory hypomelanosis.

14. A method according to any one of claims 9-13, wherein the said preparation based on NGF contains from 1 to 1000 µg/ml of NGF.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.