



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900505924
Data Deposito	20/03/1996
Data Pubblicazione	20/09/1997

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

BIS ALCANOIL ESTERI DELLA CARNITINA AD ATTIVITA' ANTIBATTERICA, ANTIMICOTICA ED ANTIPROTOZOARIA.

RM96 A000180

a nome: SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

00144 ROMA

Inventore: SCAFETTA Nazareno, TINTI Maria Ornella,

10 Depositato il n°

$$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ | \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N}^+ \\ | \\ \text{H}_3\text{C} \\ | \\ \text{X}^- \end{array} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{O}-\text{R}) \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{Y} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{O}-\text{R}_1) \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{N}^+ \\ | \\ \text{CH}_3 \\ | \\ \text{X}^- \end{array}$$

15 (I)

R e R₁, uguali o differenti, sono alcanoli lineari o ramificato, saturo o insaturo, avente da 2 a 16 atomi di carbonio;

X^- è l'anione di un acido farmacologicamente accettabile.

1.

SIGMA - TAU
INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

I composti di formula (I) presentano due centri chirali ciascuno dei quali può assumere, indipendentemente dall'altro, configurazione D oppure L.

I composti di formula (I) possiedono potente attività
5 antibatterica, antimicotica e antiprotozoaria.

La presente invenzione riguarda inoltre procedimenti per la preparazione dei composti (I) e composizioni farmaceutiche per il trattamento di patologie cutanee sostenute da batteri, lieviti, funghi o protozoi, quali agenti patogeni di infezioni semplici o miste.

10 Quali esempi di infezioni cutanee trattabili con le composizioni della presente invenzione vanno menzionate quelle causate da dermatofiti (Tinea corporis, Tinea cruris, Tinea capitis, Tinea pedis, Tinea barbae, Tinea unguis); da lievitomorfi, quali mugghetto, cheilite, rino-faringite, vulvovaginite, balanopostite, intertrigo, pityriasi
15 versicolor, otite, onicosi, perionicosi; da batteri, quali impetigine, Staphylococcus nasal carriage, eritrasma, vaginosi; e da protozoi, quali Leishmaniosi cutanea, cheratite da Acanthamoeba, vaginite da Trichomonas.

Fra le infezioni cutanee miste vanno menzionate vulvovaginite,
20 vaginosi, balanite e balanopostite, onicosi e perionicosi, le piaghe cutanee infette nei malati di diabete, le infezioni dell'orecchio esterno e le infezioni nell'immunocompromesso.

Le composizioni della presente invenzione sono altresì utili nel trattamento di patologie infettive sostenute da ceppi resistenti ai più
25 comuni antimicotici e antibiotici e nella disinfezione di tessuti chirurgicamente esposti.

Nei composti di formula (I), R e R₁ hanno preferibilmente 9-13 atomi di carbonio .

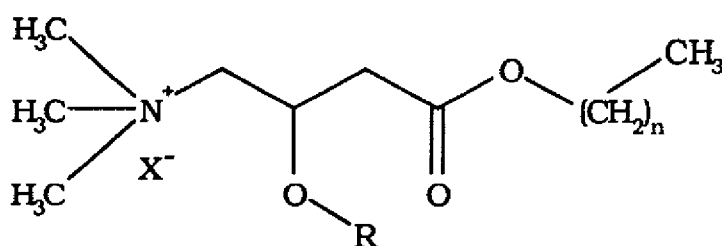
R e R₁ sono preferibilmente decanoile, undecanoile e tridecanoile.

Y è preferibilmente scelto fra trimetilene, tetrametilene, pentametilene, esametilene e orto, meta o para xililene.

X è preferibilmente scelto fra cloruro, bromuro, metansolfonato, fosfato, fumarato acido, fumarato, tartrato acido e tartrato.

Poichè i composti di formula (I) sono particolarmente adatti al trattamento delle affezioni cutanee, le composizioni preferite secondo la presente invenzione sono formulazioni dermatologiche atte all'applicazione topica, quali creme, unguenti, gel, lozioni, soluzioni e simili. Si è trovato che è opportuno che tali composizioni contengano dallo 0,5 al 2% in peso, preferibilmente dall'1 al 1,5% in peso, di uno dei composti di formula (I). Gli eccipienti da utilizzare per preparare le composizioni dell'invenzione sono ben noti e risulteranno evidenti agli esperti di tecnologia farmaceutica in base alla particolare formulazione da preparare.

Per quanto riguarda lo stato della tecnica, i composti noti alla richiedente più simili a quelli della presente invenzione sia per struttura che per attività sono gli esteri a lunga catena di acil L-carnitina di formula



in cui R è acile lineare o ramificato a 2-16 atomi di carbonio; n è un intero da 7 a 15 e X⁻ è l'anione di un acido farmacologicamente accettabile, descritti in EP-A-0 552 137 e EP-A-0 552 138, entrambi a nome della stessa richiedente del presente brevetto. EP-A-0 552 137 ne descrive l'attività come antibatterici ed EP-A-0 552 138 quali antimicotici.

Fra tali composti noti, la isovaleril L-carnitina undecil estere metansolfonato (composto designato nel seguito con la sigla ST 1103) è risultato il più attivo sia per l'attività antibatterica che antimicotica.

E' stato ora trovato che i composti di formula (I) sono dotati di attività antibatterica ed antimicotica ancora più potente, migliore tollerabilità cutanea e minore citotossicità dei composti noti.

Per tali composti è stato inoltre riscontrata l'attività antiprotozoaria non precedentemente descritta per i composti noti.

Nella preparazione dei composti di formula (I) è opportuno distinguere il caso in cui R e R₁ sono identici dal caso in cui R è diverso da R₁.

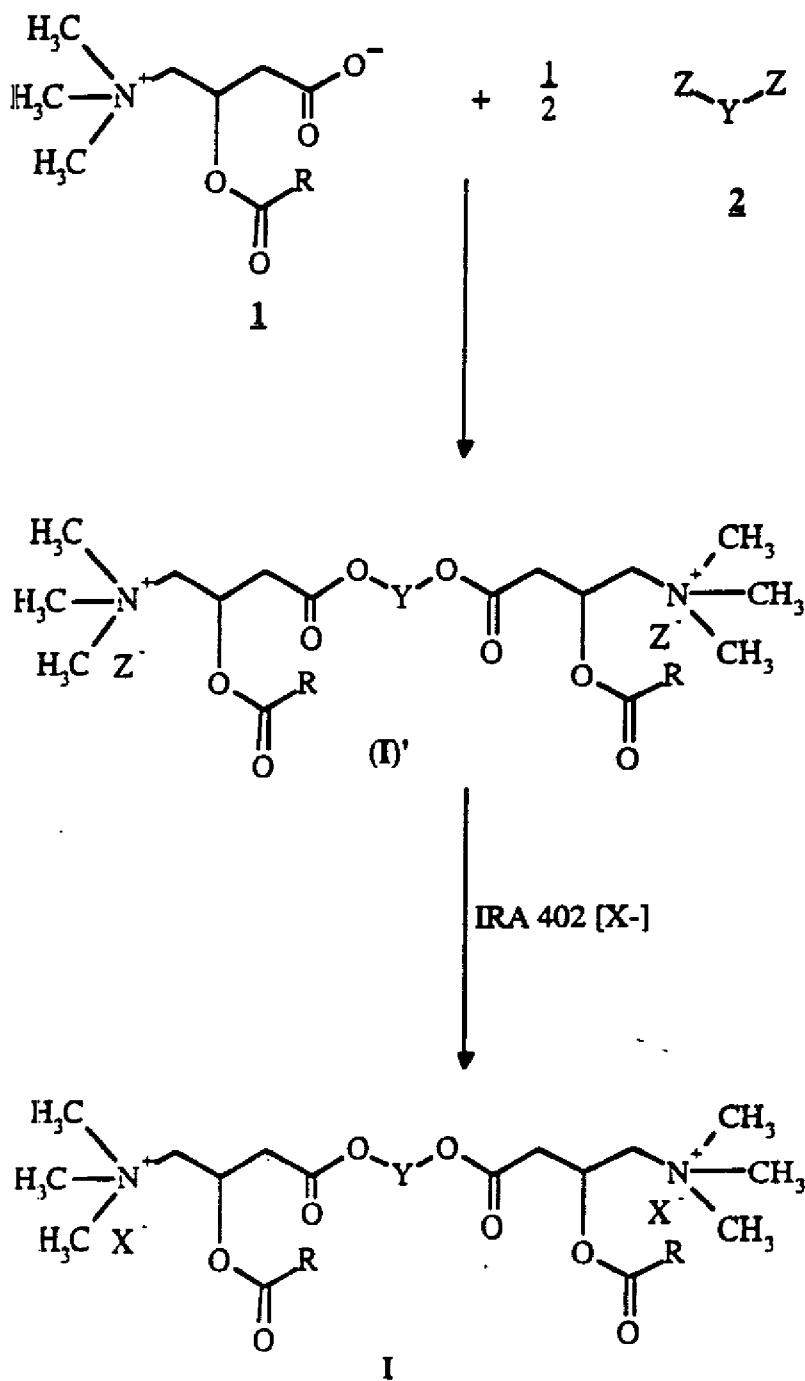
Il procedimento in cui R è uguale a R₁ che è illustrato nello schema 1 comprende sostanzialmente i seguenti stadi:

(a) sospendere la alcanoil carnitina sale interno in un solvente organico

anidro inerte come N,N-dimetilformammide, acetonitrile o cloruro di metilene;

- 5 (b) aggiungere a temperatura di 0°C-10°C il composto Z-Y-Z in cui Y ha il significato precedentemente menzionato e Z è alogeno, preferibilmente cloro o bromo, oppure O-mesile o O-tosile in una quantità equivalente alla metà delle moli della alcanoil carnitina;
- (c) mantenere la sospensione sotto agitazione ad una temperatura compresa fra 20°C e 50°C per 24 ore fino a completa solubilizzazione della miscela;
- 10 (d) precipitare il grezzo di reazione con aggiunta di un solvente come etere etilico o esano, isolare il prodotto per filtrazione e lavare con acetone o metil etil chetone fino ad ottenere un prodotto solido;
- (e) sciogliere il prodotto in acqua ed eluire su una resina basica forte tipo Amberlite IRA-402 attivata con l'acido opportuno HX per avere
- 15 il prodotto salificato nella forma voluta; e
- (f) liofilizzare o concentrare l'eluato per isolare il prodotto solido.

SCHEMA 1 (R=R₁)



Y= come precedentemente descritto

Z= Cl, Br, I, OMs, OTs

Ms= mesile

25 Ts= tostile

Il procedimento in cui R è diverso da R₁, illustrato nello schema 2, comprende sostanzialmente i seguenti stadi:

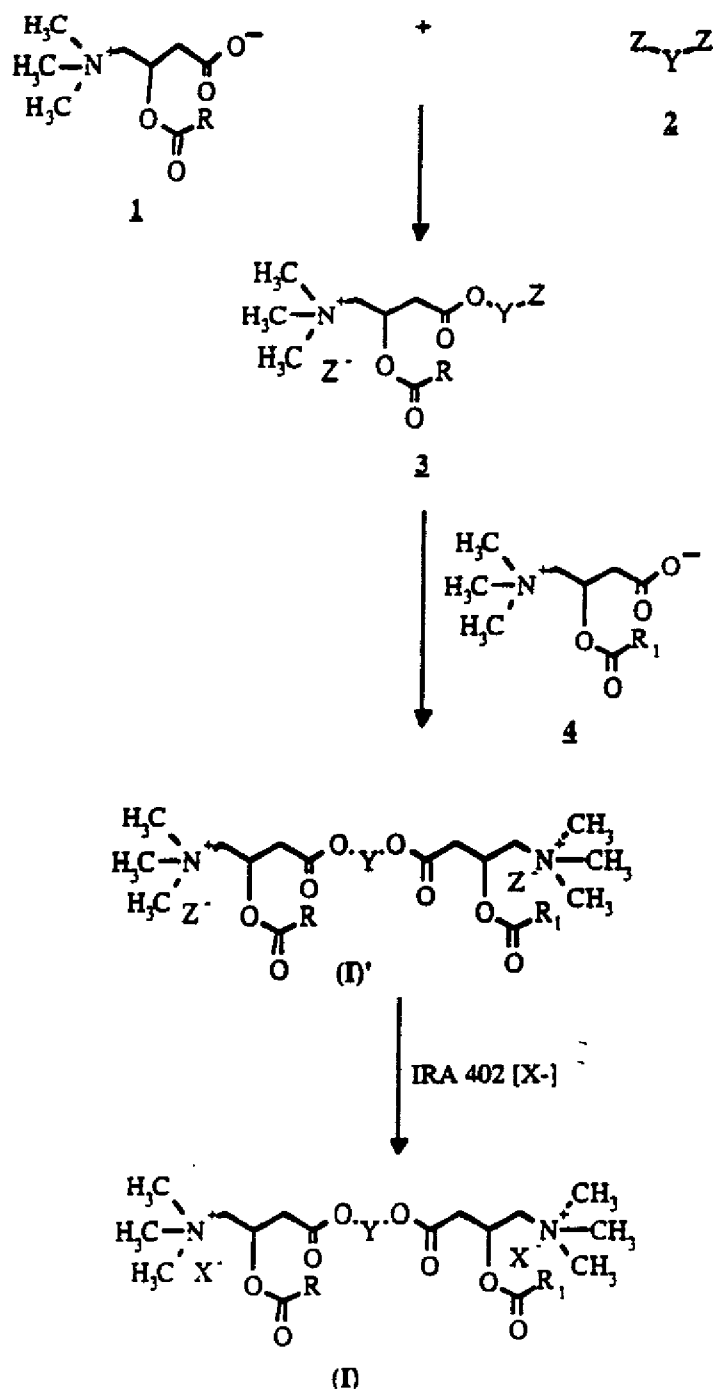
- 5 (a) sospendere la alcanoil carnitina sale interno in un solvente organico anidro inerte come N,N-dimetilformammide, acetonitrile o cloruro di metilene;
- (b) aggiungere alla temperatura di 0°C-10°C il composto Z-Y-Z in cui Y ha il significato precedentemente menzionato e Z è alogeno, preferibilmente cloro o bromo oppure O-mesile o O-tosile in quantità equimolare rispetto alla acil carnitina;
- 10 (c) mantenere la sospensione sotto agitazione ad una temperatura compresa fra 20°C e 50°C per 24 ore fino a completa solubilizzazione della miscela;
- (d) precipitare il grezzo di reazione con aggiunta di un solvente come etere etilico o esano, isolare il prodotto per filtrazione e lavare con
- 15 acetone o metil etil chetone fino ad ottenere un prodotto solido;
- (a') sospendere l'estere della alcanoil carnitina 3 in un solvente organico anidro inerte quale N,N-dimetilformammide, acetonitrile, cloruro di metilene;
- (b') aggiungere in quantità equimolare la alcanoil carnitina sale interno
- 20 in cui alcanoil è R₁;
- (c') mantenere la sospensione sotto agitazione ad una temperatura compresa fra 20°C e 50°C per 24 ore fino a completa solubilizzazione della miscela;
- (d') precipitare il grezzo di reazione con aggiunta di un solvente come
- 25 etere etilico o esano, isolare il prodotto per filtrazione e lavare con

acetone o metil etil chetone fino ad ottenere un prodotto solido;

- (e) sciogliere il prodotto in acqua ed eluire su una resina basica forte tipo Amberlite IRA-402 attivata con l'acido opportuno HX per avere il prodotto salificato nella forma voluta; e

- 5 (f) liofilizzare o concentrare l'eluato per isolare il prodotto solido.

SCHEMA 2 (R=R₁)



Y= come precedentemente descritto

Z= Cl, Br, I, OMs, OTs

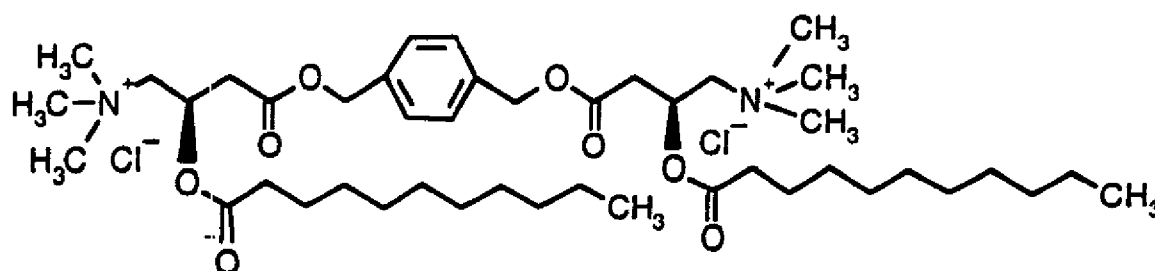
Ms= mesile

25 Ts= tosile

La preparazione e le caratteristiche chimico-fisiche di alcuni dei composti secondo l'invenzione sono illustrate negli esempi non limitativi che seguono.

ESEMPIO 1.

- 5 Preparazione di Bis (undecanoil-L-carnitina cloruro) p-xililene diestere (ST 1226).



La undecanoil-L-carnitina sale interno (8,5 g; 0,025 moli) venne sospesa in N,N-dimetil formammide anidra 50 cc.

- 15 Alla sospensione raffreddata a 0°C venne aggiunto α,α' -dibromo-
p-xilene (3,4 g; 0,013 moli). La miscela venne tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 4 ore fino a completa solubilizzazione. Alla soluzione venne aggiunto etere etilico fino a completa precipitazione di una massa gelatinosa.

- 20 Il grezzo venne lavato ripetutamente con acetone e filtrato sotto vuoto fino ad ottenere un prodotto solido 7 g. Resa molare 65% (rispetto al α,α' dibromoxilene).

Il prodotto venne sciolto in H₂O ed eluito su IRA-402 attivata in forma Cl⁻ (140 ml).

- 25 Dall'eluato liofilizzato, si ottennero 6,3 g di prodotto leggermente igroscopico.

A.E. $C_{44}H_{78}O_8N_2Cl_2$

	C%	H%	N%	Cl%
calcolato	62,68	10,40	3,32	8,41
trovato	60,25	8,98	3,03	8,10

5 H_2O 1,4%

HPLC

Colonna: SGE-SCX (5 μm) 1 250 mm X 4,0 mm

temp.: 30°C

eluente: $CH_3CN/NH_4H_2PO_4$ 50 mM 65/35 pH= 7 (NH_4OH)

10 flusso: 0,75 ml/min

Rt: 17,6 min

D
 $[\alpha]_{25} = -17$ (c = 0,6% H_2O)

15 NMR $CDCl_3$ ^1H δ 7,4(4H,s, fenile); 5,6(2H,m, 2-CH-);
 $\begin{array}{c} | \\ OCO \end{array}$

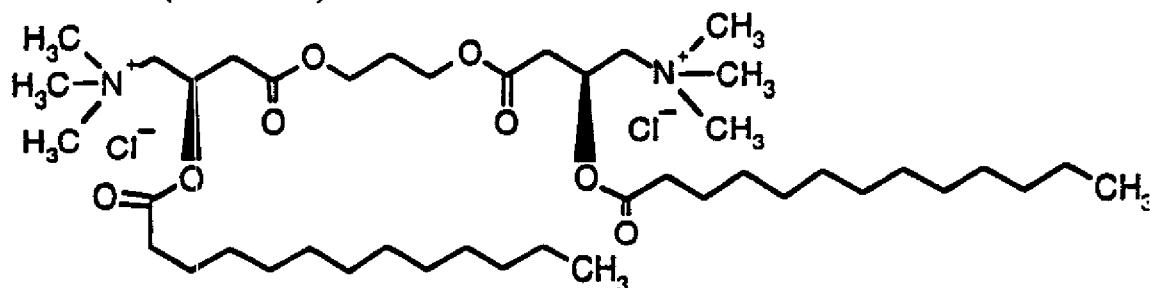
5,2(4H,s, 2 CH_2 fenile); 4,2-4,0(4H,dd, 2 N^+CH_2); 3,4(18H,s, 2(CH_3) $_3N^+$);

20 3,0-2,8(4H,m, 2 CH_2COO); 2,3(4H,t, 2 $OCOCH_2$); 1,6(4H,m, 2 CH_2CH_3);

1,1(32H,m, 2(CH_2) $_8$); 0,9(6H,t, 2 CH_3)

ESEMPIO 2

Preparazione del Bis (tridecanoil-L-carnitina cloruro) trimetilene diestere (ST 1233).



Tridecanoil-L-carnitina sale interno (5,15 g; 0,0144 moli) venne
sospesa in N,N-DMF anidra 50 cc. Alla sospensione raffreddata a 0°C
10 venne aggiunto 1,3-dibromopropano (0,73 cc; 0,0072 moli). La miscela
venne tenuta sotto agitazione per 1 notte a temperatura ambiente.

Successivamente venne aggiunto ancora un eccesso di
tridecanoil-L-carnitina sale interno (0,5 g per 2 volte) e si mantenne
ancora una notte sotto agitazione fino a completa dissoluzione.

15 Al termine della reazione venne aggiunto etere etilico fino a
completa precipitazione del grezzo di reazione.

Il solido isolato per filtrazione, circa 6 g, venne sciolto in H₂O ed
eluito su IRA-402 [Cl⁻] (120 ml).

Si ottennero 5 g del prodotto ST 1233 resa 44%.

20 A.E.: C₄₃H₈₄O₃N₂Cl₂

	C%	H%	N%	Cl%
Calcolato con 3,35% H ₂ O	60,28	10,25	3,27	8,27
trovato	60,82	10,46	3,17	8,50

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -13,2^{\circ} (c = 1\% \text{ H}_2\text{O})$$

NMR CDCl_3 ^1H δ 5,6(2H,m,2-CHOCO); 4,5(2H,d,2N⁺-CHH);

5 4,3-3,9(6H,m,2N⁺-CHH;2CH₂O); 3,5(18H,s,2(CH₃)₃N⁺);

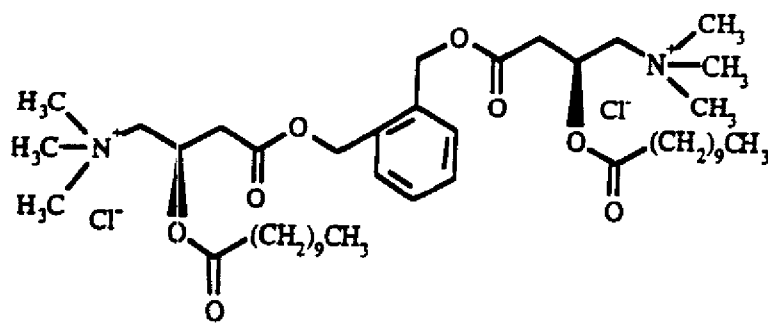
3,0-2,8(4H,2CH₂COO); 2,3(4H,t,OCOCH₂); 2,0(2H,m,-CH₂-CH₂-CH₂-);

1,6(4H,m,2CH₂CH₃); 1,2(36H,s,2(CH₂)₉); 0,8(6H,t,2CH₃)

ESEMPIO 3

Preparazione del Bis (undecanoil-L-carnitina cloruro) o-xililene

10 diestere (ST 1249).



Il prodotto preparato e isolato come descritto nell'esempio 1.

Resa 58%

A.E. $\text{C}_{44}\text{H}_{78}\text{O}_8\text{N}_2\text{Cl}_2$ rispondente

HPLC

20 Colonna: SGE-SCX (5 μm) l 250 mm X 4,0 mm

temp.: 30°C

eluente: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 50 mM 65/35 pH= 7,2 (NH_4OH)

flusso: 1 ml/min

Rt: 9,68 min

25

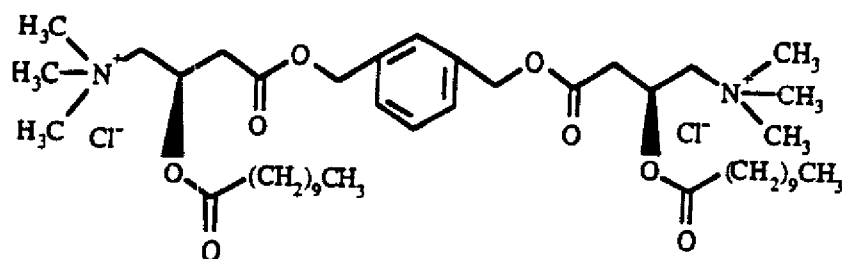
$$^{25} [\alpha]_D = -16^\circ (c = 1\% \text{ H}_2\text{O})$$

NMR rispondente come esempio 1.

5

ESEMPIO 4

Preparazione di Bis (undecanoil-L-carnitina cloruro) m-xililene diestere (ST 1250).



Il prodotto viene preparato e isolato come descritto nell'esempio 1.

Resa 78%

15 A.E. $\text{C}_{44}\text{H}_{78}\text{O}_3\text{N}_2\text{Cl}_2$ rispondente

HPLC come descritto nell'esempio 1

Rt= 9,18 min

NMR rispondente come descritto nell'esempio 1

$$^{25} [\alpha]_D = -18,2^\circ (c = 0,5\% \text{ H}_2\text{O})$$

La potente attività antimicrobica, antifungina ed antiprotozoaria dei composti della presente invenzione e la superiorità di tali composti nei confronti dei composti più simili della tecnica nota quali la già menzionata isovaleril L-carnitina undecil estere metansolfonato (ST 1103) è stata evidenziata da numerosi test farmacologici, alcuni dei quali vengono di seguito riportati.

ATTIVITA' ANTIMICROBICA IN VITRO

DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC) DI ST 1226 IN CONFRONTO CON ST 1103 SU BATTERI GRAM+ e GRAM- DI COLLEZIONE E DI FRESCO ISOLAMENTO CLINICO (DI INTERESSE DERMATOLOGICO).

MATERIALI E METODI

Da una brodo coltura overnight in Mueller-Hinton broth si standardizzano le sospensioni batteriche nel medesimo terreno ad una concentrazione finale in pozzetti microtiter di 5.0×10^4 cell./ml.

A queste sospensioni batteriche si aggiungono diluzioni scalari al mezzo in Mueller-Hinton broth delle soluzioni delle sostanze, in modo tale da ottenere un range di concentrazioni finali comprese tra 100 e 0.19 mcg/ml. Le microtiter vengono quindi poste ad incubare per 18 ore a 37°C (Cf. L. D. THRUPP, Susceptibility testing of antibiotics in liquid media, in: *Antibiotics in laboratory medicine*, V. LORIAN (Ed.), II° edition, 4, 93-150, Williams & Wilkins, Baltimore, MD 21202 U.S.A.).

RISULTATI

In tabella 1, 2a e 2b sono riportati i dati relativi rispettivamente ai ceppi di collezione ed a quelli di isolamento ospedaliero. Come si evince sia dai risultati singoli che da quelli relativi alla MIC media, ST 1226 mostra un'attività migliorativa sui batteri Gram positivi rispetto a quella evidenziata da ST 1103.

Sui ceppi batterici Gram negativi non è stato viceversa possibile rilevare differenze significative nell'attività delle 2 sostanze.

Tabella 1 Determinazione "in vitro" della MIC (mcg/ml) di ST 1226 e ST 1103 su batteri Gram positivi e Gram negativi (ceppi di collezione).

Ceppo microbico	ST 1226	ST 1103
Gram+		
<i>B. pumilus</i> CN 607	1.56	3.12
<i>S. faecalis</i> 509	1.56	1.56
<i>S. faecalis</i> 501	3.12	3.12
<i>S. aureus</i> 306 MR	6.25	6.25
<i>S. aureus</i> 303	3.12	6.25
MIC media	2.49	4.06
Gram-		
<i>S. typhimurium</i> DS	25	25
<i>E. aerogenes</i> UM	6.25	25
<i>P. vulgaris</i> UM	50	50
<i>K. oxytoca</i> 552	25	12.5
<i>E. coli</i> 92 F	25	25
MIC media	26.25	27.5

Tabella 2a Determinazione "in vitro" della MIC (mcg/ml) di ST 1226 e ST 1103 su batteri Gram+ (ceppi di fresco isolamento clinico)^a. E' indicata, quando nota, la diagnosi della affezione cutanea dalla quale è stato isolato il germe infettante.

5

Ceppo microbico		ST 1226	ST 1103	Diagnosi
10	<i>Staph. sp.</i> SG 1 II	3.12	6.25	—
	<i>Staph. aureus</i> IDI 3530	3.12	3.12	ulcera
	<i>Staph. aureus</i> IDI 3593	3.12	3.12	ulcera
	<i>Staph. aureus</i> SG II	3.12	3.12	—
	<i>Staph. epider.</i> IDI 3482	3.12	1.56	ferita purulenta
15	<i>Staph. capitis</i> IDI 3502	1.56	3.12	pustola (cuoio capelluto)
	<i>Staph. warneri</i> IDI 3482	3.12	6.25	ferita purulenta
	<i>Strept. faecalis</i> IDI 3580	6.25	6.25	ulcera
	<i>Strept. sp.</i> SG 7 II	3.12	3.12	—
	<i>Micrococcus sp.</i> IDI 3502	1.56	3.12	pustola (cuoio capelluto)
20	MIC media	3.12	3.90	

a = Ceppi SG (ceppi provenienti dall'Ospedale S. Gallicano di Roma),
ceppi IDI (ceppi provenienti dall'Istituto Dermatologico
dell'Immacolata di Roma).

Tabella 2b Determinazione "in vitro" della MIC (mcg/ml) di ST 1226 e ST 1103 su batteri Gram- (ceppi di fresco isolamento clinico)^a. E' indicata, quando nota, la diagnosi della affezione cutanea dalla quale è stato isolato il germe infettante.

Ceppo microbico	ST 1226	ST 1103	Diagnosi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IDI 3530	50	25	ulcera
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SG 5 II	50	50	—
<i>Enterobacter cloacae</i> SG 3 II	12.5	25	—
<i>Escherichia coli</i> SG 4 II	12.5	25	—
<i>Proteus sp.</i> SG 9 II	50	50	—
MIC media	35.0	35.0	

a = Ceppi SG (ceppi provenienti dall'Ospedale S. Gallicano di Roma),
ceppi IDI (ceppi provenienti dall'Istituto Dermatologico
dell'Immacolata di Roma).

DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC) DI ST 1226 IN CONFRONTO CON ST 1103 SU BATTERI ANAEROBI GRAM POSITIVI E GRAM NEGATIVI DI COLLEZIONE E DI FRESCO ISOLAMENTO CLINICO.

5

MATERIALI E METODI

Da colture in piastra di Petri in terreno WILKINS-CHALGREN (W. C.) incubate overnight in giara da anaerobiosi a 35°C, si riprende la patina batterica con Brucella broth. Si standardizza quindi a $\sim 1.0 \times 10^8$ cell./ml e le sospensioni così ottenute si distribuiscono in pozzetti di una piastra microtiter (96 wells, U bottom) in ragione di 0.2 ml/pozzetto. Contemporaneamente si preparano diluizioni a scalare al mezzo delle sostanze in esame in W. C. agar in piastre di Petri a 4 settori, che vengono quindi seminate per mezzo di un multipoint inoculator con le sospensioni batteriche prima preparate ($\sim 1.0 \times 10^5$ cell./spot). Le piastre vengono quindi poste in giara da anaerobiosi ed incubate a 35°C per 48 ore (Cf. J. E. ROSENBLATT, Antimicrobial susceptibility testing of anaerobes, in: *Antibiotics in laboratory medicine*, V. LORIAN (Ed.), II° edition, 6, 159-180, Williams & Wilkins, Baltimore, MD 21202 U.S.A.).

RISULTATI

In tabella 3 sono riportati i dati relativi alle MIC (mcg/ml) dei composti sui tre ceppi di batteri anaerobi considerati. Il valore della MIC media di ST 1226 risulta inferiore a quello riscontrato per ST 1103.

./.

Tabella 3 Determinazione "in vitro" della MIC (mcg/ml) di ST 1226 e ST 1103 su batteri anaerobi. E' indicata, quando nota, la diagnosi della affezione cutanea dalla quale è stato isolato il germe infettante.

5

Ceppo microbico		ST 1226	ST 1103	Diagnosi
10	<i>Eubacterium lentum</i> IDI 3502*	6.25	3.12	ferita purulenta
	<i>Propionibacterium acnes</i> IDI 3482*	6.25	6.25	suppurazione acneica
	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285**	12.5	25	—
	MIC media	8.33	11.45	

15 * = Gram positivo, di fresco isolamento ospedaliero (Istituto Dermatologico dell'Immacolata).

** = Gram negativo di collezione.

20 **DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC) DI ST 1226 IN CONFRONTO CON ST 1103 SU FUNGHI LIEVITOMORFI DI COLLEZIONE E DI FRESCO ISOLAMENTO CLINICO (DI INTERESSE DERMATOLOGICO).**

MATERIALI E METODI

25 Brodocolture overnight in Sabouraud broth vengono diluite, dopo opportuni lavaggi, in Yeast nitrogen base supplementato (Y. N. B. s.) con asparagina e glucosio in modo tale da contenere in pozzetti di

microtiter -5.0×10^4 CFU/ml. A queste sospensioni fungine si aggiungono diluizioni scalari al mezzo in Y. N. B. s. delle soluzioni delle sostanze, in modo tale da ottenere un range di concentrazioni finali comprese tra 100 e 0.19 mcg/ml. Le microtiter vengono quindi
5 incubate per 24-48 ore a 35°C (Cf. PFALLER M., RINALDI M. G., GALGANI J. M., BARTLETT M. S., BODY B. A., ESPINEL-INGROFF A., FROMTLING R. A., HALL G. S., HUGHES G. E., ODDS F. C., SUGAR A. M., Collaborative investigator of variables in susceptibility testing of yeasts, *Ant. Agent and Chemoth.*, 34, 9:1648-1656, 1990. COOK R., McINTYRE
10 K. A., GALGANI J. M., Effects of incubation temperature, inoculum size, and medium on agreement of macro and microdilution broth susceptibility test, results for yeasts, *Ant. Agent and Chemoth.*, 34, 8:1542-1545, 1990. ANAÏSSIE E., PAETZNICK V., BODEY G. P., Fluconazole susceptibility testing of "Candida albicans" microtiter
15 method that is independent of inoculum size, temperature, and time of reaching, *Ant. Agent and Chemoth.*, 35, 8:1641-1646, 1991).

RISULTATI

In tabella 4 e 5 sono elencati i risultati conseguiti con i 2 composti in esame, rispettivamente con i ceppi di collezione e con
20 quelli di isolamento clinico. Risulta evidente come il composto ST 1226 possegga un'attività antimicotica superiore a quella presentata da ST 1103, specie nei confronti dei ceppi di *Candida* di fresco isolamento ospedaliero e di interesse dermatologico.

Tabella 4 Determinazione "in vitro" della MIC (mcg/ml) di ST 1226 e ST 1103 su funghi lievitomorfi (ceppi di collezione).

Ceppo microbico		ST 1226	ST 1103
5	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7752	1.56	3.12
	<i>C. krusei</i> ISS 1	3.12	3.12
	<i>C. tropicalis</i> ISS 1	1.56	3.12
	<i>C. albicans</i> ISS 1	3.12	1.56
10	<i>C. albicans</i> 562	3.12	3.12
	MIC media	2.49	2.80

Tabella 5 Determinazione "in vitro" della MIC (mcg/ml) di ST 1226 e ST 1103 su funghi lievitosomi del genere *Candida* (ceppi di fresco isolamento clinico)^a. E' indicata, quando nota, la diagnosi della affezione cutanea dalla quale è stato isolato il germe infettante.

5

Ceppo microbico		ST 1226	ST 1103	Diagnosi	Trattamento ^b
	<i>Candida albicans</i> SG 14 III	1.56	6.25	Vaginite	—
	<i>Candida albicans</i> SG 7 I	3.12	3.12	Tinea unguis (mano)	—
	<i>Candida albicans</i> IDI D 3575	3.12	6.25	—	—
10	<i>Candida albicans</i> IDI D 0297	3.12	3.12	Vulvo vaginite	Pevaryl®
	<i>Candida albicans</i> IDI D 1088	3.12	3.12	—	—
	<i>Candida albicans</i> IDI D 0101	1.56	6.25	Eczema (intergluteo)	Versus®
	<i>Candida albicans</i> IDI D 1056	1.56	3.12	—	—
	<i>Candida albicans</i> SG 2 III	1.56	6.25	Vaginite	—
15	<i>Candida albicans</i> SM 1786/94	3.12	6.25	—	—
	<i>Candida albicans</i> IDI D 1046	3.12	3.12	Glossite	Daktarin®
	MIC media	2.49	4.68		

20 a = Ceppi SG (ceppi provenienti dall'Ospedale S. Gallicano di Roma),
ceppi IDI (ceppi provenienti dall'Istituto Dermatologico
dell'Immacolata di Roma), ceppo SM (ceppo proveniente
dall'ospedale S. Matteo di Pavia).

25 b = Indicazione del trattamento effettuato prima della diagnosi
ospedaliera.

DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC) DI ST 1226 IN CONFRONTO CON ST 1103 SU FUNGHI FILAMENTOSI DI COLLEZIONE.

5 MATERIALI E METODI

Da colture di 72 ore in Sabouraud si prelevano i conidi mediante lavaggi con Sabouraud broth e Tween 80 (1 goccia per 10 ml di terreno). Dopo una grossolana filtrazione e lavaggio, le sospensioni ottenute vengono standardizzate ad una concentrazione finale in pozzetto di microtiter di $\sim 5.0 \times 10^4$ CFU/ml. A queste sospensioni fungine si aggiungono diluizioni scalari al mezzo in Y. N. B. s. delle soluzioni delle sostanze, in modo tale da ottenere un range di concentrazioni finali comprese tra 100 e 0.19 mcg/ml. Le microtiters vengono quindi incubate per 48/72 ore a 35°C.

15 RISULTATI

In tabella 6 sono elencati i risultati conseguiti con le 2 molecole. Sia i dati singoli che il valore medio di MIC depongono nettamente a favore dell'attività di ST 1226, decisamente superiore a quella di ST 1103.

20

Tabella 6 Determinazione "in vitro" della MIC (mcg/ml) di ST 1226 e ST 1103 su funghi filamentosi (ceppi di collezione).

5	Ceppo microbico	ST 1226	ST 1103
	<i>Fusarium</i> sp. F 77	3.12	6.25
	<i>Penicillium</i> sp. 1302	1.56	12.5
	<i>Mucor mucedo</i> ATCC 7941	25	50
10	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	6.25	12.5
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 28212	6.25	12.5
	MIC media	8.43	18.75

15 **DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC) DI ST 1226 IN CONFRONTO CON ST 1103 SU FUNGHI DERMATOFITI DI FRESCO ISOLAMENTO CLINICO (DI INTERESSE DERMATOLOGICO).**

20 MATERIALI E METODI

Da colture di ~7 giorni in Potato dextrose agar a 30°C si prelevano frammenti miceliari, micro e macroaleuriospore mediante lavaggi con Sabouraud broth e Tween 80 (1 goccia per 10 ml di terreno). Dopo grossolana filtrazione e lavaggio si standardizza la carica infettante in Yeast nitrogen base supplementato con asparagina e glucosio (YNBs) a 1.0×10^5 particelle infettanti/ml finali in pozzetti di

25

microtiter. A queste sospensioni fungine si aggiungono diluizioni scalari al mezzo in Y. N. B. s. delle soluzioni delle sostanze, in modo tale da ottenere un range di concentrazioni finali comprese tra 100 e 0.19 mcg/ml. Le microtiter vengono quindi incubate per ~96-120 ore a 30°C.

RISULTATI

In tabella 7 sono riassunti i risultati relativi ai ceppi fungini saggiati. Appare evidente la maggior attività di ST 1226 rispetto a ST 1103 nei confronti dei ceppi di dermatofiti.

Tabella 7 Determinazione "in vitro" della MIC (mcg/ml) di ST 1226 e ST 1103 su dermatofiti (ceppi di fresco isolamento clinico)^a. E' indicata, quando nota, la diagnosi della affezione cutanea dalla quale è stato isolato il germe infettante.

5

	Ceppo microbico	ST 1226	ST 1103	Diagnosi	Trattamento ^b
10	<i>Tr. mentagrophytes</i> IDI D 1101	1.56	12.5	Epidermomicosi (volto)	—
	<i>Tr. mentagrophytes</i> SG 8 II	1.56	12.5	Tinea cruris	—
	<i>Tr. mentagrophytes</i> SG 3 I	1.56	12.5	Tinea pedis	—
	<i>Tr. mentagrophytes</i> SG 4 II	1.56	12.5	Tinea cruris	—
	<i>Tr. mentagrophytes</i> SG 5 III	3.12	12.5	Tinea pedis	—
15	<i>Tr. mentagrophytes</i> IDI D 1027	3.12	12.5	Eczema impet. (mento)	—
	<i>Tr. mentagrophytes</i> IDI D 1049	1.56	12.5	—	—
	<i>Tr. quinckeanum</i> NCPF 309*	1.56	6.25	—	—
20	<i>Tr. rubrum</i> IDI D 0222	1.56	12.5	Onicomicosi alluci (sx e dx)	—
	<i>Tr. rubrum</i> IDI D 0261	1.56	12.5	Eczema disidrosico (piele dx)	Fargan® Gentalyn β® e cortisonico
25	<i>Tr. rubrum</i> SG 13 III	1.56	12.5	Tinea pedis	—
	<i>Tr. rubrum</i> IDI D 1017	1.56	12.5	Onicomicosi (alluce dx)	Azolmen®
	<i>Tr. rubrum</i> IDI D 0252	1.56	25	Impetigo (arto sup. sx)	Rifocin®
	<i>Tr. rubrum</i> IDI D 1150	1.56	12.5	Epidermofizia (arti sup., inf. e natiche)	Gentalyn®
30	<i>Tr. rubrum</i> IDI D 1155	1.56	3.12	—	—
	<i>Microsporum canis</i> IDI D 1123	1.56	12.5	Epidermofizia (dorso)	Gentalyn®
	<i>Microsporum canis</i> IDI D 0238	12.5	25	Tricofizia (arto sup. dx)	Nerisona®
	<i>Microsporum canis</i> IDI D 1011	3.12	12.5	Eczema (collo)	Gentalyn® e cortisonici
35	<i>Microsporum canis</i> IMM 3868*	1.56	12.5	—	—
	<i>Epidermoph. floccosum</i> IDI D 0011	12.5	12.5	Epidermofizia (interdigitale piede)	—
	<i>Epidermophyton floccosum</i> SG 6 II	6.25	12.5	Tinea pedis	—
40	<i>Epidermophyton floccosum</i> SG 3 III	6.25	25	—	—
	MIC media	3.19	13.49		

* = Ceppi di collezione.

45 a = Ceppi SG (ceppi provenienti dall'Ospedale S. Gallicano di Roma),
ceppi IDI (ceppi provenienti dall'Istituto Dermatologico
dell'Immacolata di Roma).

b = Indicazione del trattamento effettuato prima della diagnosi
ospedaliera.

./.

DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC) DI ST 1226 IN CONFRONTO A ST 1103 SU PROTOZOI (CEPPI DI *Trichomonas vaginalis*).

5 MATERIALI E METODI

Da una brodocoltura di 24 ore a 37°C e 5% di CO₂ in brodo T. Y. M. di DIAMOND al 10% in FCS scomplementato si procede ad una standardizzazione nello stesso terreno ad una concentrazione finale in pozzetti di microtiter di 2.5×10^5 cell/ml. Nei pozzetti contenenti l'inoculo si aggiungono diluizioni scalari al mezzo delle soluzioni delle sostanze in modo tale da ottenere un range di concentrazioni finali comprese tra 100 e 0.19 mcg/ml. Le microtiter sono quindi poste in termostato per 24 ore a 37°C e al 5% di CO₂. La MIC è definita la minima concentrazione alla quale non è possibile notare alcuna mobilità dei parassiti, neanche una semplice motilità dei flagelli o della membrana ondulante (Cf. JULIANO C., MARTINOTTI M. G., CAPPUCCINELLI P., in vitro effect of microtubule inhibitors on *T. vaginalis*, *Microbiologia*, 8:31-42, 1985. LÖVGREN T. and SALMELA I., In vitro sensitivity of *T. vaginalis* and *C. albicans* to chemotherapeutic agents, *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 86:155-158, 1978).

RISULTATI

In tabella 8 sono elencati i risultati conseguiti con le 2 sostanze: ST 1226 evidenzia una attività doppia rispetto a quella di ST 1103.

Tabella 8 Determinazione "in vitro" della MIC (mcg/ml) di ST 1226 e ST 1103 su ceppi di *Trichomonas vaginalis*^a.

Ceppo microbico	ST 1226	ST 1103
<i>T. vaginalis</i> SS-2	12.5	25
<i>T. vaginalis</i> SS-9	12.5	25
<i>T. vaginalis</i> SS-20 ^b	12.5	25
<i>T. vaginalis</i> SS-22 ^b	12.5	25
MIC media	12.5	25

5 a = Ceppi provenienti dall'Istituto di Microbiologia e Virologia dell'Università di Sassari.

b = ceppi resistenti a Metronidazolo (MIC di 25 e 50 mcg/ml).

ATTIVITA' IN VIVO

5 DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA' ANTIINFETTIVA "IN VIVO" DI
ST 1226 E ST 1103 IN UN MODELLO MURINO DI INFEZIONE MISTA
CUTANEA DA DERMATOFITA (*T. quinckeanum*) E BATTERIO GRAM
POSITIVO (*S. aureus*).

MATERIALI E METODI

Animali

10 Sono stati utilizzati topi maschi inbred BALB/c (C. RIVER) di 6
settimane (5 per gruppo sperimentale).

Ceppi microbici

15 Gli animali vengono infettati per via topica con ceppi patogeni di
Trichophyton (*T. quinckeanum* NCPF 309) e di *Staphylococcus* (*S.*
aureus LC1).

Procedura sperimentale

20 Dopo aver preparato sospensioni di microaleuriospore fungine e
di cellule batteriche alla concentrazione, rispettivamente, di 5.0×10^7
cell/ml e 1.0×10^7 cell/ml, si provvede a distribuire 0.2 ml di ciascuna
sospensione sulla zona dorsale superiore degli animali,
precedentemente rasata e scarificata per mezzo di una lama di bisturi
fino al "luccichio" della stessa. Dopo ~30 ore dal challenge si pongono
sulla superficie infettata ~50 mg di ciascuna sostanza veicolata da un gel
(1% in principio attivo) e si prosegue il trattamento una volta al giorno

./.

per 5 giorni consecutivi. Due giorni dopo l'ultimo trattamento si sacrificano gli animali, si asporta il lembo di pelle interessato all'infezione e dopo omogeneizzazione meccanica, si procede ad una conta selettiva dei 2 agenti patogeni (Mycobiotic agar per il fungo e Mannitol Salt agar per il batterio). Si valuta infine secondo una scala arbitraria semiquantitativa la presenza del fungo e con una normale conta delle CFU (Colony Forming Units) del batterio.

RISULTATI

In Tabella 9 sono illustrati i risultati conseguiti con le 2 molecole. Si può concludere che le 2 molecole hanno una capacità antinfettiva coincidente nei confronti di *S. aureus*, mentre ST 1226 evidenzia una attività antifungina superiore a ST 1103.

Tabella 9 Capacità antinfettiva "in vivo" di ST 1226 in confronto a ST 1103 in un modello murino di infezione cutanea mista (*T. quinckeanum* NCPF 309 + *S. aureus* LC 1)^a

Sostanze	<i>S. aureus</i>		<i>T. quinckeanum</i>	
	Animali guariti (%)	Animali non guariti (media CFU/topo)	Animali guariti (%)	Animali non guariti (crescita fungina) ^c
Controllo	0	2.73x10 ⁴	0	++
Veicolo	0	3.36x10 ⁴	0	++/+
ST 1103 ^b	80	40	80	+
ST 1226 ^b	80	50	100	—

5 a = 5 animali per gruppo sperimentale.

b = Gli animali sono stati trattati per via topica, per 5 giorni consecutivi, con ~50 mg/die di ciascuna sostanza all'1% in gel (Idrossietil cellulosa 2.5 g, Glicerina 7.0 g, Glicol propilenico 7.0 g, H₂O q. b. a 100 ml).

10 c = +++ crescita fungina confluyente (da 1 ml di omogenato tissutale)

++ crescita fungina semiconfluyente (da 1 ml di omogenato tissutale)

+ crescita fungina moderata (da 1 ml di omogenato tissutale).

**VALUTAZIONE DELLA TOLLERABILITA' CUTANEA DI TRATTAMENTI
RIPETUTI (10 GIORNI) DI ST 1226 E ST 1103 SU PELLE
SCARIFICATA DI TOPO.**

5 MATERIALI E METODI

Animali

Sono stati utilizzati topi CD1 (C. RIVER) di 6 settimane di età (5 animali per gruppo sperimentale).

Formulazione delle sostanze

10 Le molecole in esame sono state sospese (1%) in un gel composto da: Idrossietil cellulosa 2.5g, Glicerina 7.0g, Glicol propilenico 7.0g, acqua q.b. a 100.

Procedura sperimentale

15 Dopo aver rasato la zona centrale del dorso degli animali è stata praticata un'abrasione della cute per mezzo di una lama di bisturi. Al giorno +1 rispetto alla lesione cutanea è iniziato il trattamento (~50 mg di ciascuna formulazione) che, effettuato una volta al giorno, si è protratto per 10 giorni. Controlli macroscopici dello stato della cute dei vari animali sono stati condotti ai giorni +5, +7, +9, +11, utilizzando
20 come parametri valutativi: ERITEMA (E), DESQUAMAZIONE (D), CRACKING (C), con i seguenti gradi di gravità:

(E)	(D)	(C)
0 = nessuno 1 = leggero (appena visibile) 2 = moderato (ben definito) 3 = grave (rosso porpora)	0 = nessuno 1 = leggero (appena visibile) 2 = moderato (croste e scaglie) 3 = grave (marcata con aree denudate)	0 = nessuno 1 = leggero (dell'epidermide) 2 = moderato (derma) 3 = grave (con sanguinamento)

La media dei valori riscontrati per ciascun parametro nello stesso gruppo di animali ci ha consentito di valutare complessivamente il danno tissutale indotto dai vari composti.

5 RISULTATI

In tabella 10 sono elencati i risultati ottenuti con le molecole in esame espressi come media dei singoli parametri registrati sugli animali di ciascun gruppo. E' possibile evidenziare una migliore tollerabilità cutanea di ST 1226 rispetto a ST 1103.

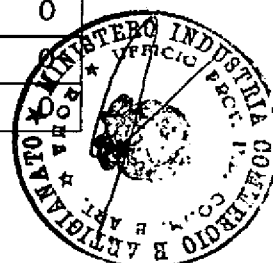
Tabella 10 Tollerabilità cutanea di somministrazioni topiche ripetute di ST 1226 e ST 1103 su pelle scarificata di topo. Scala arbitraria di valutazione (eritema, desquamazione, cracking) effettuata ai giorni +5, +7, +9 e +11 con assegnazione di punteggio da 0 (nessun effetto) a 3 (grave alterazione). Valutazione media per gruppo sperimentale (5 animali per gruppo).

Campioni Sperimentali	+5 ^a			+7 ^a			+9 ^a			+11 ^a		
	E	D	C	E	D	C	E	D	C	E	D	C
Controllo	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Veicolo	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ST 1103	1.2	0.4	0	0.4	0.4	0	0	0	0	0	0	0
ST 1226	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a = giorni successivi alla scarificazione cutanea.

20 MAR. 1996

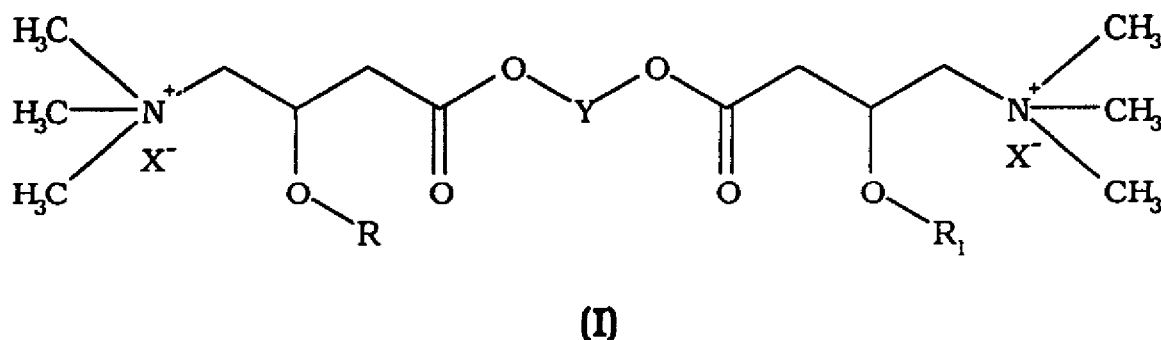
SIGMA TAU
IND. FARM. RUNITE s.p.a.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA



RIVENDICAZIONI

2496 A 000180

1. Composto di formula generale (I)



in cui:

R e R₁, uguale o differenti, sono alcanoile lineare o ramificato, saturo o insaturo, avente da 2 a 16 atomi di carbonio;

10 Y è una catena alchilenica lineare o ramificata avente da 3 a 6 atomi di carbonio, oppure orto, meta o para xililene; e

X⁻ è l'anione di un acido farmacologicamente accettabile.

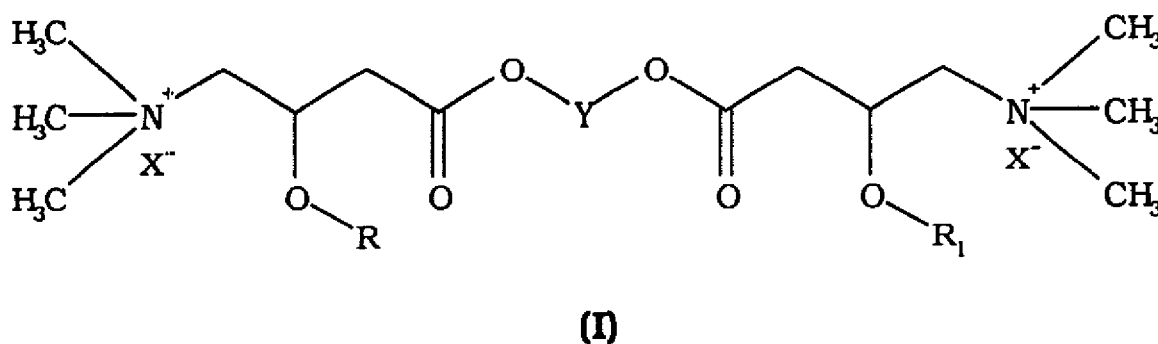
2. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui R e R₁ sono alcanoile a 9-13 atomi di carbonio.

- 15 3. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui Y è scelto fra trimetilene, tetrametilene, pentametilene ed esametilene.

4. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui X⁻ è scelto fra cloruro, bromuro, metansolfonato, fosfato, fumarato acido, fumarato, tartrato acido e tartrato.

- 20 5. Quale composto della rivendicazione 1, Bis (undecanoil-L-carnitina cloruro) p-xililene diestere.

6. Quale composto della rivendicazione 1, Bis (tridecanoil-L-carnitina cloruro) trimetilene diestere.
7. Quale composto della rivendicazione 1, Bis (undecanoil-L-carnitina cloruro) o-xililene diestere.
- 5 8. Quale composto della rivendicazione 1, Bis (undecanoil-L-carnitina cloruro) m-xililene diestere.
9. Composizione farmaceutica comprendente quale principio attivo un composto di formula generale (I)



in cui:

R e R₁, uguale o differenti, sono alcanoli lineari o ramificati, saturi o insaturi, aventi da 2 a 16 atomi di carbonio;

Y è una catena alchilenica lineare o ramificata avente da 3 a 6 atomi di carbonio, oppure orto, meta o para xililene; e

X⁻ è l'anione di un acido farmacologicamente accettabile, e un eccipiente farmacologicamente accettabile.

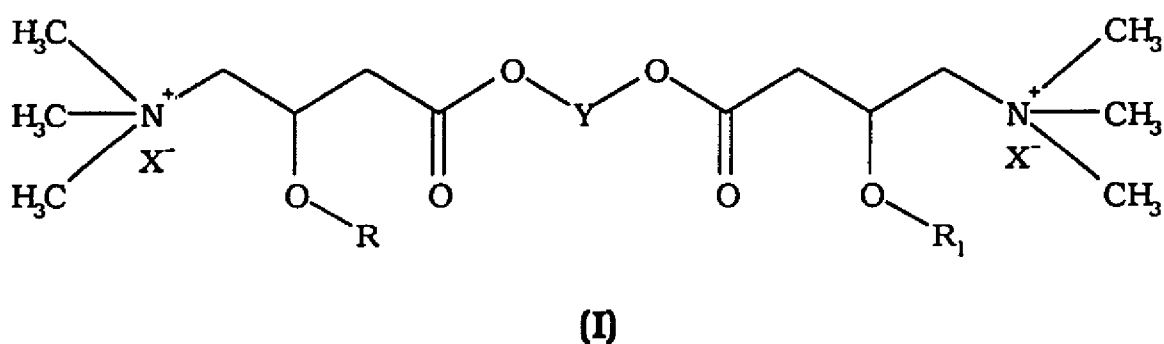
10. Composizione secondo la rivendicazione 9 atta alla applicazione topica per il trattamento di affezioni cutanee sostenute da batteri,

lieviti, funghi o protozoi.

11. Composizione secondo la rivendicazione 10 comprendente dallo
0,5 al 2% in peso, preferibilmente dall'1 al 1,5% in peso, di
composto di formula (I) e un eccipiente farmacologicamente
accettabile.

12. Composizione secondo le rivendicazioni 10 o 11 sotto forma di
crema, unguento, gel, lozione o soluzione.

13. Procedimento per la preparazione di composti di formula generale
(I)



in cui:

R e R₁ sono uguali e sono alcanoile lineare o ramificato, saturo
o insaturo, avente da 2 a 16 atomi di carbonio;

Y è una catena alchilenica lineare o ramificata avente da 3 a 6
atomi di carbonio, oppure orto, meta o para xililene;

X⁻ è l'anione di un acido farmacologicamente accettabile.

comprendente gli stadi di

(a) sospendere la alcanoil carnitina sale interno in un solvente

organico anidro inerte come N,N-dimetilformamide, acetonitrile, cloruro di metilene;

5 (b) aggiungere a temperatura di 0°C-10°C il composto Z-Y-Z in cui Y ha il significato precedentemente menzionato e Z è alogeno, preferibilmente cloro o bromo oppure O-mesile o O-tosile, in una quantità equivalente alla metà delle moli della alcanoil carnitina;

10 (c) mantenere la sospensione sotto agitazione ad una temperatura compresa fra 20°C e 50°C per 24 ore fino a completa solubilizzazione della miscela;

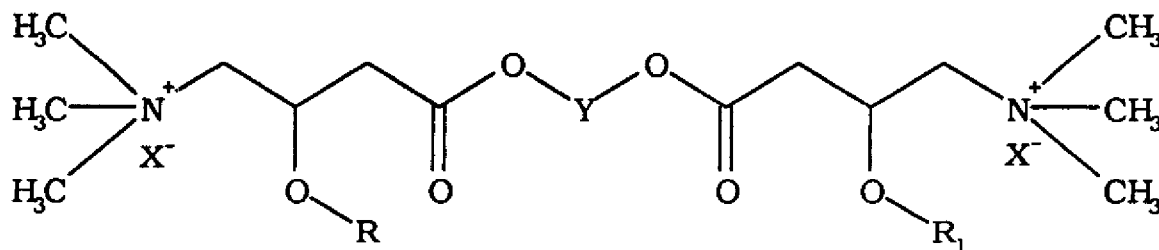
(d) precipitare il grezzo di reazione con aggiunta di un solvente come etere etilico o esano, isolare il prodotto per filtrazione e lavare con acetone o metil etil chetone fino ad ottenere un prodotto solido;

15 (e) sciogliere il prodotto in acqua ed eluire su una resina basica forte tipo Amberlite IRA-402 attivata con l'acido opportuno HX per avere il prodotto salificato nella forma voluta; e

(f) liofilizzare l'eluato per isolare il prodotto solido.

14. Procedimento per la preparazione di composti di formula generale

(I)



(I)

5

in cui:

R e R₁ sono diversi e sono alcanoile lineare o ramificato, saturo o insaturo, avente da 2 a 16 atomi di carbonio;

10

Y è una catena alchilenica lineare o ramificata avente da 3 a 6 atomi di carbonio, oppure orto, meta o para xililene;

X⁻ è l'anione di un acido farmacologicamente accettabile.

comprendente gli stadi di

15

(a) sospendere la alcanoil carnitina sale interno in un solvente organico anidro inerte come N,N-dimetilformammide, acetonitrile o cloruro di metilene;

20

(b) aggiungere alla temperatura di 0°C-10°C il composto Z-Y-Z in cui Y ha il significato precedentemente menzionato e Z è alogeno, preferibilmente cloro o bromo oppure O-mesile o O-tosile in quantità equimolare rispetto alla acil carnitina;

(c) mantenere la sospensione sotto agitazione ad una temperatura

./.

compresa fra 20°C e 50°C per 24 ore fino a completa solubilizzazione della miscela;

(d) precipitare il grezzo di reazione con aggiunta di un solvente come etere etilico o esano, isolare il prodotto per filtrazione e lavare con acetone o metil etil chetone fino ad ottenere un prodotto solido;

(a') sospendere l'estere della alcanoil carnitina 3 in un solvente organico anidro inerte quale N,N-dimetilformammide, acetonitrile, cloruro di metilene;

(b') aggiungere in quantità equimolare la alcanoil carnitina sale interno in cui alcanoile è R₁;

(c') mantenere la sospensione sotto agitazione ad una temperatura compresa fra 20°C e 50°C per 24 ore fino a completa solubilizzazione della miscela;

(d') precipitare il grezzo di reazione con aggiunta di un solvente come etere etilico o esano, isolare il prodotto per filtrazione e lavare con acetone o metil etil chetone fino ad ottenere un prodotto solido;

(e) sciogliere il prodotto in acqua ed eluire su una resina basica forte tipo Amberlite IRA-402 attivata con l'acido opportuno HX per avere il prodotto salificato nella forma voluta; e

(f) liofilizzare l'eluato per isolare il prodotto solido.

20 MAR. 1996

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE s.p.a.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA



./.