



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611289-7 A2**

(22) Data de Depósito: 05/05/2006
(43) Data da Publicação: 31/08/2010
(RPI 2069)



(51) Int.Cl.:
A61K 8/36
A61K 31/192
A61P 17/10
A61Q 19/00

(54) Título: **USO DE ÁCIDO ADAMATIL
METOXIDIFENIL PROPENÓICO PARA O
TRATAMENTO DE ACNE**

(30) Prioridade Unionista: 20/05/2005 IT RM2005 A 000248

(73) Titular(es): Sigma-Tau Industrie Famaceutiche Riunite S.P.A.

(72) Inventor(es): Claudio Pisano, Loredana Vesci

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006062088 de 05/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/122883 de 23/11/2006

(57) Resumo: USO DE ÁCIDO ADAMATIL METOXIDIFENIL PROPENÓICO PARA O TRATAMENTO DE ACNE. A presente invenção refere-se ao uso de uma substância pertencendo à classe de retinóides atípicos para o tratamento tópico de acne é descrito. Em particular, os efeitos sobre um modelo animal para essa doença de pele de um composto farmacêutico ou cosmético para uso tópico contendo ácido adamantil metoxidifenil propenólco formulado em um gel são demonstrados.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE ÁCIDO ADAMATIL METOXIDIFENIL PROPENÓICO PARA O TRATAMENTO DE ACNE**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A invenção descrita aqui se refere ao uso de uma substância pertencendo à classe de retinóides atípicos para o tratamento tópico de acne.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 A acne é um distúrbio multifuncional o qual ocorre comumente durante a adolescência e a qual, algumas vezes, cicatriza espontaneamente mas, mais freqüentemente, dura um longo tempo e requer tratamentos tópicos ou sistêmicos específicos com substâncias químicas, tais como peróxido de benzoíla, retinóides, antibióticos e antiandrogênios. Infelizmente, alguns desses produtos podem produzir efeitos colaterais, tais como vermelhidão,
15 secura da pele e reações alérgicas. Além disso, um dos problemas fundamentais no tratamento de acne e outras doenças da pele é o cruzamento da camada epidérmica, a qual representa a barreira fisiológica natural ao ingresso de fármacos. Na verdade, para manter um efeito farmacológico local, aplicação tópica é usada através de administração do princípio ativo formulado em pomadas, cremes ou géis, usados como veículo.

20 Lecitina, um fosfolípídio de origem natural, é usado em determinados preparados cosméticos ou farmacêuticos como o principal componente ou como um emulsificante. Sua função, a despeito de ser estrutural, pode ser funcional em termos de transporte do princípio ativo para a pele. Na verdade, a similaridade química entre a lecitina (fosfatidil colina) e os componentes lipídicos das membranas celulares sugere que veículos baseados em lecitina podem ser bem tolerados pelo corpo e, ao mesmo tempo, aumentam a ação farmacológica (Scartazzini e Luisi, 1988 J. Physiol. Chem. 91 , 823-833).

30 O termo "acne" (do Grego *akni*: eflorescência) descreve as lesões foliculares as quais aparecem durante a adolescência e as quais estão relacionadas à seborréia e à formação de comedões. Ela é uma doença ex-

tremamente comum a qual, em um grau variável, afeta aproximadamente 90% dos adolescentes, mas somente 10% desses requerem intervenção médica e apenas 1% dos últimos possuem problemas clínicos os quais são difíceis de resolver.

5 A acne é uma inflamação crônica do aparelho pilo-sebáceo a qual se apresenta em várias formas, como comedões, pústulas, nódulos, cistos e cicatrizes. Existem muitas variedades clínicas com relação à aparência, curso, idade de início e localização. A forma mais comum é a acne juvenil, a qual aparece na puberdade e se cura espontaneamente em torno
10 da idade de 25, mesmo embora ela possa aparecer depois, reocorrer e regredir após 30 anos de idade (Kraning e outros. 1979 J. Invest. Dermatol. 73, 395-401).

 O início é geralmente durante a idade de desenvolvimento, com lesões típicas da pele: comedões, pápulas, nódulos e cistos. Os comedões
15 são folículos intumescidos com sebo, comumente denominados "espinhas", quando o orifício folicular está fechado e "cravos" quando o orifício folicular se abre; eles estão distribuídos com maior frequência em torno do nariz e sobre ele, sobre a testa, em torno e nos ouvidos e, finalmente, sobre o queixo. As pápulas são a complicação inflamatória dos comedões e aparecem
20 como áreas elevadas avermelhadas de vários tamanhos. Elas duram uns poucos dias e desaparecem sem vestígios. Pústulas são lesões de cor amarelada, de formato hemisférico e cheias de pus, as quais superam as pápulas. Elas duram dois a três dias e extravasam para o exterior, com formação de crosta. Nódulos são grandes formações sólidas, frequentemente doloro-
25 sas à pressão, produzidas por um infiltrado inflamatório. Cistos são grandes áreas elevadas cheias de pus, muito dolorosos ao toque, os quais permanecem inalterados por semanas e, diferente das outras lesões da acne, podem se transformar facilmente em cicatrizes, essas sendo conseqüências perma-
nentes da acne as quais são antiestéticas e, algumas vezes, desfigurantes.

30 Os principais fatores patogênicos envolvidos na etiopatogênese da acne são: 1) hiper-secreção sebácea; 2) hiperqueratose folicular; 3) colonização bacteriana dos folículos; 4) o início de um processo inflamatório.

Indivíduos com acne secretam mais sebo do que os controle e esse fator parece estar correlacionado à gravidade da acne. O desenvolvimento e atividade secretória das glândulas sebáceas são controlados pelos hormônios andrógenos, produzidos pelo testículo, pelo ovário e pelas glândulas adrenais.

A testosterona influencia a atividade proliferativa da glândula sebácea, a qual tem receptores com uma alta afinidade por esses hormônios e também tem a enzima 5- α -reductase, capaz de converter testosterona em sua fração ativa biológica, dihidrotestosterona. Os fatores hormonais estão envolvidos nos surtos cíclicos de acne durante a fase prematura em mulheres.

Hiperqueratose folicular é um evento fundamental para o desenvolvimento das lesões da acne e é em virtude, em parte, da proliferação aumentada da epiderme e parcialmente ao desprendimento retardado dos coméocitos. O resultado é um espessamento da parede folicular, obstruindo a saída do sebo o qual, então, estagna e forma comedões. Sob essas condições, *Propionibacterium Acnes*, uma bactéria anaeróbica, tende a se desenvolver e proliferar (Strauss e outros, 1974 J. Invest. Dermatol. 62, 321-325; Harris e outros, 1983 J. Am. Acad. Dermatol. 8, 200-203), produzindo ácidos graxos livres com capacidade irritante e comedogênica, estimulando a resposta imune. Finalmente, inflamação é em virtude da passagem de substâncias biologicamente ativas do duto pilo-sebáceo para a derme. Os tratamentos disponíveis podem ser divididos em tratamentos queratolíticos e bacteriostáticos se eles se referem à reconstrução celular e ação antibacteriana, respectivamente.

As estratégias terapêuticas dependem da gravidade do distúrbio. Medicamentos para uso tópico são preferidos para formas médias ou moderadas de acne. Os cremes mais comuns são aqueles baseados em peróxido de benzoíla, o qual seca os pontos e bloqueia a infecção.

Existem três tipos de tratamento tópico para acne disponíveis hoje. Esses são baseados em diferentes mecanismos de ação; retinóides, agentes comedolíticos, os quais diminuem o processo de descamação de

forma a reduzir o número de comedões e microcomedões; antibióticos, com atividade bactericida os quais atuam através de morte direta das formas de *P. acnes*, também tendo um leve efeito indireto sobre a comedogênese; terapia combinada, usando retinóides e antibióticos tópicos, para pacientes
 5 que sofrem de formas graves de acne, com lesões comedogênicas e inflamatórias ao mesmo tempo.

Para o fenômeno de acne não particularmente grave, Retin-A, também conhecida como tretinoína, é um agente anticomedogênico o qual é aplicado diretamente à pele. Sua ação, na forma de uma loção ou creme, é
 10 queratolítica, isto é, ela restaura o processo normal de formação de queratina e impede a formação de comedões (cravos).

A pesquisa no campo dermatológico por novas soluções terapêuticas está constantemente evoluindo. A última geração de soluções terapêuticas agora disponível é a seguinte:

15 1. Tazaroteno, um produto sintético o qual interage especificamente com receptores de vitamina A. Assim como sobre a acne, ele é eficaz no tratamento de psoríase;

2. Ácido azeláico tem produzido resultados alternativos em estudos na Europa e é caracterizado por um amplo espectro de ação dupla, antimicrobiana e de queratinização; na verdade, ele também é usado em casos
 20 de hiperpigmentação cutânea (Graupe e outros, 1996, Cutis 57, 20-35); e

3. Adapaleno, um derivado de ácido naftóico com atividade retinóide. Esse é um modulador de diferenciação celular com um efeito de queratinização; o qual é eficaz e menos irritante do que o ácido retinóico. Ele é
 25 comercializado sobre a marca Differin® e é usado para o tratamento tópico de acne *vulgaris*, onde comedões, pápulas e pústulas predominam.

O pedido de patente internacional WO03/011808 descreve uma nova classe de compostos definidos como ácidos retinóides atípicos os quais são descritos como tendo uso antitumoral. Os compostos descritos
 30 nesse pedido incluem ácido adamantil metoxidifenil propenóico (ST1898).

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

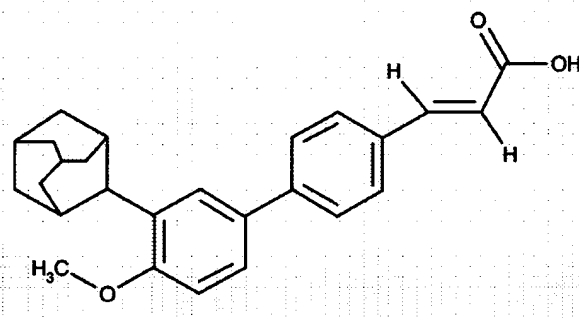
O principal objetivo da presente invenção se refere à descoberta

de que o ácido adamantil metoxidifenil propenóico tem atividade antiacne no modelo animal usado com uma referência para essa doença.

Essa atividade comedolítica não pôde ser prevista em virtude da ausência de referências estruturais definidas sobre substâncias pertencendo à mesma classe química (derivados adamantil difenílicos de ácido propenóico).

O principal objetivo da presente invenção, portanto, é o uso de ácido adamantil metoxidifenil propenóico para o preparo de um composto farmacêutico ou cosmético para uso tópico para o tratamento de acne.

10 A fórmula desse composto é como segue:



A síntese química desse compostos é descrita no pedido de Patente Internacional WO03/011808 (vide, em particular, exemplo 20).

Outro objetivo da presente invenção é também uma composição farmacêutica ou cosmética para tratamento tópico de acne contendo ácido adamantil metoxidifenil propenóico, como o ingrediente ativo, junto com outros excipientes e/ou veículos farmacêuticamente aceitáveis.

O termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado pela farmacopéia (Européia, Britânica ou dos Estados Unidos) para uso animal e, mais particularmente, uso humano.

20 Exemplos desses excipientes são: glicose, lactose, sacarose, gelatina, amida, estearatos, monoestearatos, palmitatos, glicerol, água, etanol, lipídios, fosfolipídios, agentes tamponados, tais como dehidrogenato de fosfato de sódio ou sais de amônio, misturas desses, etc.

Outros exemplos de excipientes ou veículos são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. Martin.

A composição da presente invenção pode ser formulada na for-

ma de creme, pomada, gel, espuma, solução em spray ou emplastos com liberação sustentada. A composição da presente invenção está, de preferência, na forma de gel.

5 Mais preferivelmente, a composição da presente invenção é um gel de lecitina tal como, por exemplo, Epikuron 200[®], o qual é uma lecitina de soja purificada, isto é, uma fosfatidil colina cerácea purificada de sementes de soja através de cromatografia em coluna para uso na indústria farmacêutica (pureza de mais de 92%).

10 A quantidade de princípio ativo presente na composição da invenção pode ser facilmente calculada com base nos exemplos reportados no presente pedido de patente e de testes clínicos subsequentes. A composição da presente invenção contém, de preferência, 0,1 mg de princípio ativo por 100 mg de gel de lecitina.

15 A invenção é ilustrada pelos exemplos a seguir os quais não são limitativos do escopo da invenção.

DESCRIÇÃO DO DESENHO

A Figura 1 mostra os efeitos de tratamento tópico com ST1898 (Formulação 1) sobre a pele de camundongos rhino. Esse tratamento teve um efeito muito acentuado sobre a redução do número, dimensões e teor
20 áspero dos utrículos/pseudocomedões, bem como sobre a morfologia das glândulas sebáceas, as quais se tornaram mais atroficas (setas na figura). A hiperplasia da epiderme (B), comparado com os camundongos não tratados, também era particularmente clara (A). Além disso, a pele dos camundongos rhino tratados manifestou um defeito na fase catagênica do folículo piloso, o
25 qual envolvia a perda completa de pêlo pela sexta semana de vida e o desenvolvimento dos assim denominados utrículos/pseudocomedões (C na Fig. 1), os quais representam modelos de comedões abertos histologicamente similares às lesões "retencionais" da acne. A pele de camundongos rhino também era caracterizada por atrofia das glândulas sebáceas (setas na Fig.
30 1) e pela presença de cistos na porção profunda da derme (asterisco na Fig. 1, apenas parcialmente visível, uma vez que as imagens mostram apenas a porção mais superficial da pele).

EXEMPLOS

Exemplo 1

Preparo e Caracterização dos Organogéis

Os seguintes foram usados para os subseqüentes preparos: lecitina, extrato de semente de soja (Epikuron 200[®]), palmitato de isopropila, ácido ascórbico, molibdato de amônio, cristais de iodo, fosfato de tetrametilamônio, carbono descolorizante e dehidrogen fosfato de sódio. Além disso, clorofórmio, cloreto de metileno, metanol, etanol, sulfóxido de dimetila (DM-SO) e uma solução aquosa de amônia (30%).

O lipídio de referência POPC (1-palmitoil-Z-oleoil-sn-glicero-S-fosfatidil colina) foi adquirido da Avanti Polar Lipids (Canadá) e usado sem outra purificação.

O princípio ativo ácido adamantil metoxidifenil propenóico (ST1898) foi sintetizado e purificado pela Sigma-Tau (Pomezia, Roma).

Método de Preparo do Gel

A solução de lecitina foi preparada através de dissolução de lecitina em palmitato de isopropila (IPP), através de agitação magnética a 40-50°C em poucos minutos ou umas poucas horas, dependendo do percentual em peso de lecitina. Cada sistema de solvente-lecitina produziu um gel após a adição de uma pequena quantidade de água, geralmente expressa como W_0 , indicando a proporção molar entre a água e a lecitina, de acordo com a equação 1:

$$w_0 = \frac{[H_2O]}{[lecitina]} \quad \text{Eq. 1}$$

O gel foi formado quando a água estava completamente dispersa na fase orgânica, um fenômeno geralmente dependente da concentração de lecitina, da agitação magnética e da natureza do solvente usado. Sob as condições usadas nesse estudo, a gelificação da solução de lecitina/IPP ocorreu em intervalos de tempo os quais oscilavam de uns poucos segundos a uns poucos minutos.

Exemplo 2

Preparo da Composição de ST1898 - Formulação 1

Preparo do Formulado de ST1898 na Fase de Gel

As quantidades requeridas de ST1898 e lecitina Epikuron 200 foram dissolvidas em IPP (ST1898: 0,1%, lecitina 47%, IPP 52,9%), deixando a solução sob agitação magnética durante o tempo necessário para dissolução completa (2-12 horas, dependendo da concentração de lecitina) em uma temperatura de 60-70°C.

Todos os componentes, incluindo o solvente IPP, foram gravimetricamente medidos. Por razões práticas (dissolução completa do fármaco), foi útil preparar uma solução de lecitina/IPP e, então, dissolver o fármaco com essa fase orgânica. Apenas após essa etapa a quantidade de água necessária para gelificação foi adicionada. O recipiente foi protegido da luz ao ser coberto com uma folha de alumínio, dada a fotossensibilidade do retinóide. Nos casos nos quais a solução não se tornou homogênea imediatamente, ela foi gentilmente irradiada. O volume de água, adicionado usando uma microseringa de Hamilton, foi calculado de acordo com a equação 2:

$$V_{H_2O}(mL) = \frac{m_{EP200}(g)}{760} \times 18 \times w_0 \quad \text{Eq. 2}$$

onde

V_{H_2O} representa o volume de água a ser adicionado (em ml),

m_{EP200} é a quantidade de lecitina Epikuron 200 (em g) e

W_0 é a proporção molar desejada de água e lecitina (vide eq. 1).

Exemplo 3

Procedimentos Analíticos

Espectrometria por UV-Vis foi usada para caracterizar o retinóide ST1898 quantitativamente dissolvido no solvente DMSO e incorporado na fase de gel de lecitina/IPP, usando um espectrofotômetro com arranjo de diodo (Agilent HP8452A), com uma resolução de 2 nm, usando cadinhos de quartzo de 1 cm. Transferência do organogel contendo o retinóide ST1898 para o cadinho requereu elevação da temperatura (aproximadamente 60°C), dado a alta viscosidade do material, seguido por resfriamento para realizar a análise.

Análise por HPLC

A análise por HPLC do retinóide ST1898 dissolvido em DMSO e incorporado na fase de gel foi realizada com o aparelho de HPLC HP1050 (Agilent), proporcionado com um detector com arranjo de diodo de UV-Vis e o software HP ChemStation. O procedimento para a análise quantitativa do fármaco envolve eluição isocrática (metanol/água, na proporção volumétrica de 80/20, com 0,2% de TFA) sobre uma coluna de Fase Reversa Nucleosil C18, 3 μ m (dimensões de partícula), 125 x 4 mm; fluxo de 1,5 ml/min; volume injetado igual a 5 μ l (sob essas condições, uma pressão estacionária de aproximadamente 14 MPa (140 bar) foi registrada). Detecção foi através de espectrofotometria, usando absorbância (330 nm). Condições típicas são injeção de 5 μ l de soluções de ST1898 em DMSO. O tempo de retenção observado era igual a aproximadamente 8 minutos.

A análise do fármaco ST1898 incorporado na fase de gel de lecitina/IPP requereu diluição preliminar com clorofórmio para reduzir a viscosidade da matriz, de modo que ela pudesse ser injetada na coluna de cromatografia. Na fase de determinação máxima de solubilidade, centrifugação foi usada antes de levar a amostra de gel para análise. As condições de eluição eram similares às aquelas reportadas acima, mesmo se o fluxo de efluente fosse otimizado de acordo com a concentração de lecitina (por exemplo, 1,5 ml/min).

Condições típicas proporcionadas para a injeção de ST1898 a 0,2% peso/peso em organogel de lecitina Epikuron 200 a 42% peso/peso (aproximadamente 800 mM) em IPP ($W_0 = 3$) adequadamente diluída em clorofórmio.

Determinação Quantitativa via HPLC com Detecção através de Espectrofluorimetria

A análise foi realizada com o aparelho de HPLC (System Gold, Beckman), proporcionado com um detector fluorimétrico ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 475$ nm), eluição isocrática (metanol/água, em uma proporção volumétrica de 80/20, com 0,2% de TFA) sobre uma coluna de Fase Reversa C18 Lichrospher 100, 5 μ m (dimensões de partícula), 125 x 4 mm; fluxo de 1,0 ml/min; volume injetado igual a 10 μ l. Condições típicas envolviam a injeção

de 10 µl de solução de ST1898 em THF. O tempo de retenção observado era igual a aproximadamente 16,5 minutos.

Exemplo 4

Ação Comedolítica do ST1898 (Formulação 1) sobre Pseudocomedões Epi- 5 dérmicos no Modelo Animal com Camundongos Rhino

Modelo Animal Usado no Estudo

O camundongo rhino ($hr^{rh}hr^{rh}$) é um alelo do camundongo sem
pêlo e é um modelo animal experimental para acne não inflamatória. Nesse
animal, após o primeiro revestimento de pêlos, uma falha na fase de catagê-
10 nese resulta em uma perda prematura e irreversível de pêlos na idade de 4
semanas. O folículo falha em se reconstruir. Ao contrário, a parte inferior da
unidade folicular original se desenvolve em cistos que produzem uma cama-
da córnea enquanto se tornam permanentemente situados na derme profun-
da e aumentam à medida que a idade do animal avança. Enquanto isso, os
15 canais pilosos originais (parte superior da unidade folicular original) se trans-
formam em cavidades ampuliformes ou utrículos. Esses utrículos são cheios
de células córneas e sebo e aumentam progressivamente em virtude da
produção e acúmulo de material córneo. Histologicamente, eles se asseme-
lham à lesões acneicas retencionais típicas ou comedões. Contudo, eles não
20 são visíveis a olho nu e não podem ser espremidos entre os dedos. Confor-
me na acne humana, as glândulas sebáceas se retraem progressivamente à
medida que o utrículo se forma e aumenta. Finalmente, a pele do camun-
dongo rhino parece mole e redundante, em virtude de uma falta de fibras
elásticas. Portanto, a pele de camundongos rhino adultos é caracterizada
25 pelos utrículos que são derivados da zona infundibular das unidades folicula-
res originais. Esses são histologicamente similares às lesões de acne reten-
cionais, isto é, microcomedões. Camundongos rhino, portanto, têm sido usa-
dos durante os últimos 30 anos em protocolos *in vivo* objetivados à testagem
de atividade comedolítica de novos fármacos, topicamente e, até um ponto
30 menor, sistemicamente administrados para o tratamento de acne.

Efeitos comedolíticos de vários agentes antiacne, em particular
retinóides administrados topicamente, sobre a pele do camundongo rhino

foram reportados primeiro em 1970 usando métodos histológicos qualitativos os quais mostraram: 1) a transformação de parte dos utrículos/comedões em canais pilosos curtos, estreitos, não-hiperplásicos com glândulas sebáceas bem desenvolvidas, 2) a involução completa de parte do utrículo, levando a longos trechos de epiderme de aparência normal, 3) um aumento na espessura da epiderme, 4) nenhum efeito sobre os cistos na derme profunda. Essas modificações começam a aparecer após 1 semana de tratamento tópico com retinóides (por exemplo, um ácido all-trans-retinóico ou adapaleno) e atingem um máximo após 3 semanas.

No momento, a técnica mais amplamente usada na seleção de agentes comedolíticos tópicos para avaliação e medição de sua atividade comedolítica é análise de imagem histológica quantitativa de seções de pele de camundongos rhino a partir de uma biópsia da pele obtida no final de um período de tratamento de três semanas. Várias medições microscópicas permitem calcular os seguintes parâmetros: o número total de utrículos na pele (comedões) por centímetro de extensão de *stratum corneum*, o perfil do comedão o qual proporciona uma medida do aspecto morfológico do comedão (isto é, ampuliforme versus estreito) e a espessura epidérmica.

De acordo com o estudo, o qual levou à presente invenção, camundongos rhino machos (RHJ/LeJ) (lote Nº 2004256 nascido em 28/07/2004) e camundongos rhino fêmeas (lote Nº 2004257, 8 nascidos em 11/08/2004 e 7 nascidos em 21/07/2004), de 5-6 semanas de idade com um peso corporal de 18-22 g no início do experimento fornecidos pela Charles River Italy S.p.A., alojados em gaiolas de Makrolon (26,7 x 20,7 x 14 cm de tamanho); um rato em cada gaiola, com uma cobertura plástica com um filtro e com uma grade sobre uma cama de serragem estéril.

Alimento e água estavam disponíveis *ad libitum*. A dieta diária de cada rato envolvia ração (GLP 4RF21, fornecida pela companhia Mucedola) durante todo o período do estudo. Os certificados analíticos da reação e água dos animais foram mantidos nas premissas proporcionadas pela Sigma-Tau.

Os animais foram alojados em ciclos de claro/escuro de 12 ho-

ras (7:00-19:00 luz).

Os parâmetros da sala do animal foram ajustados como segue: temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa igual a $55 \pm 15\%$, filtros de ar trocados a cada 15-20 horas.

5 As condições ambientais foram monitoradas e os dados foram mantidos nos Arquivos de Alojamento Animal.

2 grupos foram formados com 6 animais em cada.

A autorização para uso dos animais nos laboratórios da Sigma-Tau foi obtida do Ministério da Saúde. O tratamento e uso dos animais estavam de acordo com as Diretrizes Européias N^{os} 86/609 e com o sistema Regulatório Italiano (Decreto Legislativo N^o 116, Art. 6, 27 de Janeiro de 1992).
10 Cada parte do estudo referente ao tratamento de animais foi aprovado pelo departamento veterinário da Sigma-Tau.

Distribuição Aleatória

15 Os empregados do alojamento de animais transferiram os camundongos das caixas para as gaiolas aleatoriamente. Cada gaiola foi, então, etiquetada com um cartão identificando o tipo de tratamento (substância usada, dose, via de administração e número de identificação do animal).

Tratamentos

20 Os animais foram tratados através da aplicação tópica ao dorso durante 45 s dos compostos examinados dosados usando uma micropipeta com volume de 50 μl , uma vez por dia durante 5 dias consecutivos por semana, durante um período de 3 semanas (nos laboratórios da Sigma-Tau). Os produtos aplicados foram: ST1898 a 0,1% no veículo (Formulação 1: organogel de lecitina Epikuron 200, 46,9% peso/peso (aproximadamente 800
25 mM) em palmitato de isopropila, com $W_0 = 3$) e animais não tratados.

Tipos e Freqüências de Registros

Os animais foram precisamente observados, dando atenção particular ao comportamento e aos sinais locais e gerais, a cada dia, antes e
30 após tratamento, verificando e registrado quaisquer mortes. Além disso, todos os animais foram pesados antes de cada tratamento com os compostos sob exame e com o veículo.

Biópsias Teciduais

Após três dias do final do tratamento, cada camundongo foi morto através de deslocamento cervical e o pêlo foi removido do dorso do animal. Biópsias foram tomadas usando perfurações de 6 mm da área tratada, 5 fixadas em formalina tamponada a 10% e incluídas em parafina (fixando e passando através de etanol a 70% nos laboratórios da Sigma-Tau, inclusão em parafina no BMC Laboratory, IDI). 3 seções foram obtidas de cada biópsia, de 3 µm de espessura e 150 µm de distância e coradas com corante hematoxilina-eosina.

10 Exame Histológico e Análise da Imagem

Usando o microscópio KS300.3 (Zeiss, Jena, Alemanha) com ampliação de 20X, uma análise morfométrica e avaliação microscópica quantitativa dos seguintes parâmetros foi realizada:

- ✓ número de utrículos/pseudocomedões por unidade de comprimento (cm) da camada córnea;
- ✓ diâmetro máximo dos utrículos/pseudocomedões (D);
- ✓ diâmetro do orifício dos utrículos/pseudocomedões (d);
- ✓ área da epiderme interfolicular (S) e comprimento (L) da camada basal da epiderme na mesma área.

20 O perfil dos comedões foi expresso como $r = d/D$ e a espessura da epiderme como S/L em µm.

Avaliação dos Dados

A análise dos dados obtidos e, mais precisamente, a comparação entre os dados da comparação de cada grupo diferente de animais, foi 25 realizada usando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para dados não-emparelhados.

Usando essa formulação de gel (Formulação 1 - ST1898 a 0,1% em lecitina/IPP a 47/53 peso/peso; $W_0 = 3$) para experimentos *in vivo*, foi possível documentar a atividade comedolítica potencial da substância após 30 tratamento tópico sobre camundongos rhino.

Resultados:

Ação Anti-Comedolítica de ST1898 (Formulação 1) e Adapaleno sobre os

Utrículos/Pseudocomedões Epidérmicos de Camundongos Rhino

A partir da literatura, a capacidade dos retinóides de induzir à comedólise e espessamento da epiderme é conhecida, efeitos em virtude de uma hiperproliferação das células epidérmicas (ou hiperplasia) na pele dos camundongos rhino (Kligman L. H. e Kligman A. M., 1979 J. Invest. Dermatol. 73, 354-8; Mezick e outros, 1984 J. Am. Acad. Dermatol. 11, 902-4; Ashton e outros, 1984 J. Invest. Dermatol. 82, 632-5).

O modelo *in vivo* usado nesse projeto de pesquisa é o camundongo rhino mouse ($hr^{rh}hr^{rh}$), o qual é alélico para o camundongo sem pêlos ($hr^{rh}hr^{rh}$) e representa um modelo animal experimental para acne não-inflamatória. Esse modelo tem sido usado durante os últimos vinte anos para avaliar a eficácia terapêutica, em particular eficácia comedolítica, de compostos antiacne aplicados topicamente e também administrados sistemicamente. Os camundongos rhino manifestam várias alterações da pele, incluindo um defeito na fase catagênica do folículo capilar, o qual envolvia a perda completa pela sexta semana de vida e o desenvolvimento dos assim denominados utrículos/pseudocomedões (C na Fig. 1), os quais representam modelos de comedões abertos histologicamente similares às lesões "retencionais" da acne. A pele de camundongos rhino também era caracterizada por atrofia das glândulas sebáceas (setas na Fig. 1) e pela presença de cistos na porção profunda da derme (asterisco na Fig. 1, apenas parcialmente visível, uma vez que as imagens mostram a porção mais superficial da pele).

ST1898 (Formulação 1) aplicado topicamente, tinha características farmacologicamente úteis para tratamento de acne, com um efeito comedolítico e antiinflamatório e levando a uma redução no número de comedões. ST1898, portanto, atuou como um modulador dos processos de diferenciação celular de queratinização e inflamação os quais, na patologia de acne, são grandemente alterados (Fig. 1).

Conforme pode ser visto na Figura 1, o tratamento tópico da pele de camundongos rhino com ST1898 (Formulação 1) teve um efeito muito acentuado sobre a redução do número, dimensões e teor córneo dos utrículos/pseudocomedões (Tabela 1), bem como sobre a morfologia das glându-

las sebáceas, as quais se tornaram mais atróficas (setas na figura). A hiperplasia da epiderme (B), comparado com os camundongos não tratados, também era particularmente clara (A).

Tabela 1

- 5 Análise das Imagens dos Parâmetros Epidérmicos sobre a Pele de Camundongos Rhino Machos e Fêmeas

Tratamentos	Nº de	Comedões ^a (cm)	Perfil de comedão (r =	Espessura dos (µM
Não tratados	6	27,8 ±	0,65 ±	23,5 ±
ST1898 a 0,1%	6	**7,5 ±	** 1,01 ±	**82,7 ±

Os dados são a média ± SD.

*P<0,05 e **P<0,01 vs. o grupo não tratado (Mann-Whitney).

^a Número de comedões por comprimento de camada córnea ex-

- 10 presso em cm.

O parâmetro diretamente correlacionado ao efeito comedolítico de um fármaco após tratamento tópico da acne é r (Tab. 1) (Mezick e outros, 1984 J. Am. Acad. Dermatol. 11 , 902-4; Bouclier e outros, 1991 Skin Pharmacol. 4, 65-73): se r é igual a ou maior do que 1, o composto sob exame tem um efeito comedolítico demonstrado pela redução no número de lesões típicas da acne.

Comparado com o controle representado pelo grupo de camundongos não tratados, pode ser observado que o valor desse parâmetro é alterado pelo ST1898 (Formulação 1), o qual produziu a alteração dos comedões fechados para comedões abertos com um valor de r igual a 1, demonstrando um efeito comedolítico poderoso. Além disso, nos histogramas, pode ser observado que o parâmetro o qual descreve a espessura epidérmica aumenta após tratamento com ST1898.

Exemplo 5

- 25 Preparo da Composição de ST1898 - Formulação 2 - Preparo do Formulado de ST1898 na Fase de Gel

Formulações: ST1898 a 0,1% e a 0,05% no veículo.

Veículo: carbômero 980, propileno glicol, poloxâmero, edentato dissódico, metil hidroxibenzoato, fenoxietanol, hidróxido de sódio e água purificada

Controle Negativo: sem tratamento

Adapaleno (gel Differin®) foi usado como composto de referência (0,1%).

5 Exemplo 6

Ação Comedolítica de ST1898 (Formulação 2) Sobre Pseudocomedões Epi- dérmicos em Camundongos Rhino

A autorização para uso de animais em laboratórios da Sigma-Tau foi obtida pela Autoridade de Saúde Italiana. O Cuidado e Alojamento de
10 animais estavam de acordo com as Diretrizes Européias no. 86/609 e com a DL 116 Italiana, 27 de Janeiro de 1992. Todas as partes desse estudo referentes aos cuidados com animais foram aprovadas pelo veterinário oficial da Sigma-Tau.

Fornecimento e Alojamento de Animais

15 Os camundongos (Charles River Italy S.p.A. para o Jackson Laboratory) foram alojados em gaiolas internas de Makrolon (26,7 x 20,7 x 14 cm) (1 camundongo/gaiola) com cobertura de grade de aço e cama de ser-
ragem de sabugos para forragem isentos de poeira pulverizados e esteriliza-
dos. Os animais foram alojados sob um ciclo de claro-escuro, mantendo-se a
20 temperatura e umidade constantes. Parâmetros das salas dos animais foram avaliados como segue: temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $55 \pm 15\%$, cerca de 15-20 trocas de ar filtrado/hora e 12 horas de ciclo circadiano de luz artificial (7 da manhã/7 da noite). As condições ambientais foram mo-
nitoradas; os dados foram retidos nos Arquivos do Alojamento de Animais.

25 Dieta e Suprimento de Água

Água potável foi fornecida *ad libitum*. A cada camundongo foi oferecida diariamente uma dieta em pélete completo (GLP 4RF21 , Mucedo-
la) no decorrer do estudo. Os certificados analíticos do alimento e água dos
animais foram retidos nas instalações da Sigma-Tau.

30 Design de Estudo - Tratamento de Camundongos

30 camundongos rhino (RHJ/LeJ) (Jackson Laboratory), 15 ma-
chos e 15 fêmeas (6-8 semanas de idade) foram subdivididos em 6 camun-

5 dongos/grupo. Dois grupos foram tratados com ST1898 (Formulação 2) (0,1% e 0,05% no veículo), um grupo com adapaleno (gel Differin®), usado como composto de referência (0,1%), um grupo com veículo (o mesmo da fórmula de gel Differin®: carbômero 80, propileno glicol, poloxâmero, edenta-

10 to dissódico, metil hidroxibenzoato, fenoxietanol, hidróxido de sódio e água purificada).

Um grupo não foi tratado (controle). Os fármacos (50 µl) foram aplicados com o dedo em uma luva estéril topicamente sobre a pele dorsal (massagem durante 30-45 seg), uma vez por dia durante 5 dias consecuti-

15 vos/semana (excluindo Sábados e Domingos) durante 3 dias consecutivos. Três dias após a última aplicação, os camundongos foram sacrificados através de deslocamento cervical. Duas biópsias por perfuração da pele (6 mm) foram tomadas imediatamente após a morte de todos os animais sacrificados. As biópsias foram fixadas em formalina (solução de formalina tampona-

da a 10%) e incrustadas em parafina.

Exame post-mortem

Análise de imagem histológica quantitativa foi avaliada como o número total de utrículos epidérmicos (comedões) por centímetro de comprimento de *stratum corneum*, o perfil do comedão e a espessura epidérmica. A partir de uma biópsia, seções da pele de 3 µm de espessura foram ob-

20 tidas em intervalos de 150 µm e foram coradas com hematoxilina-eosina. A segunda biópsia foi mantida armazenada para registros.

Análise morfométrica assistida por computador das seções de pele coradas foi realizada usando um sistema Zeiss KS300.3 (parâmetros n.

25 1, 3 e 4). Para o comprimento total do *stratum corneum*, medição com um equipamento micrométrico foi usada. Os seguintes parâmetros microscópicos foram medidos:

1) sobre cada utrículo/comedão epidérmico aberto, o maior diâmetro ou diâmetro tomado na metade da profundidade (D) e diâmetro do

30 orifício na superfície (d),

2) comprimento das três seções, tomado como o comprimento total do *stratum corneum*,

3) número total de utrículos/comedões epidérmicos nas três seções,

4) em áreas interfoliculares, superfície (S) da epiderme e comprimento (L) da camada basal correspondente.

5 A partir desses dados, os valores médios (\pm SD) foram calculados para cada grupo de animais:

1) número de utrículos/(comedões)/comprimento de *stratum corneum* (cm);

2) perfil do comedão, calculado como $r = d/D$,

10 3) espessura epidérmica, calculada como S/L em μm .

Administração do Artigo de Teste

Uma aplicação tópica sobre a pele dorsal (massagem durante 30-45 seg) foi realizada de 50 μl aplicados com o dedo em uma luva. O tratamento foi feito uma vez por dia durante 5 dias consecutivos/semana (excluindo Sábados e Domingos) durante 3 semanas consecutivas.

Análise de Dados

Análise estatística foi realizada usando o "t" teste de Student duplamente configurado para comparar dados obtidos dos diferentes grupos de animais.

20 Uma diferença significativa foi considerada quando um p valor (P) < 0,05 foi atingido.

Outros métodos estatísticos foram usados se fosse considerado necessário.

Resultados

25 Durante o tratamento, o peso corporal dos camundongos foi registrado para controlar o estado de saúde dos camundongos. Nenhuma variação significativa no peso corporal foi encontrada (tabela 2).

Os resultados da análise de camundongos rhino tratados com ST1898 (Formulação 2) e de camundongos de controle são reportados na tabela 2 e nas figuras 1-8. Os achados mais relevantes são resumidos aqui depois.

Análise Histológica

A análise dos espécimes histológicos dos cinco grupos de camundongos rhino mostrou:

a) Nenhum efeito do tratamento com veículo sobre o número e morfologia de utrículos (comedões) e sobre a morfologia e espessura epidérmica, quando comparado com a pele não tratada. Números comedões aumentados cheios de células cornificadas foram observados em todos os espécimes. As glândulas sebáceas pareciam acentuadamente atroficas. A epiderme interfolicular limitada de camundongos não tratados e tratados com veículo compreendia uma única camada de células basais, duas a três camadas de células espinhosas e uma camada de células granulares contendo grânulos de querato-hialina. O stratum corneum parecia espesso e frouxamente organizado, com uma aparência em "onda de cesto" característica.

b) Uma forte redução no número de comedões na pele de camundongos tratados com ST1898. Tal efeito parecia comparável em camundongos tratados com ST1898 e camundongos tratados com adapaleno. Em todos os animais tratados com composto ativo, a maioria dos folículos se tornou canais pilosos estreitos os quais não mostram acúmulo de material córneo. Além disso, glândulas sebáceas distintamente aumentadas estavam conectadas aos canais foliculares.

c) Uma hiperplasia da epiderme interfolicular em camundongos tratados com ST1898 e tratados com adapaleno. Especificamente, a epiderme interfolicular compreendia uma única camada de células basais, 3-6 camadas de células espinhosas e 3-5 camadas de células granulares contendo numerosos grânulos grandes de querato-hialina. O *stratum corneum* era mais compacto, em particular em sua porção inferior. De nota, a hiperplasia epidérmica parecia mais acentuada na pele de camundongos tratados com adapaleno quando comparado aos camundongos tratados com ST1898. Além disso, um leve infiltrado de linfócitos dérmicos foi observado em todos os animais tratados com composto ativo.

Análise Morfométrica

Número de Comedões. O número de comedões por centímetro

de stratum corneum era comparável em camundongos não tratados e camundongos tratados com o veículo.

Esse valor era altamente reduzido em camundongos tratados com ST1898 a 0,1% e 0,05% quando comparado com controles não tratados e tratados com veículo (p valor < 0,0005). O número de comedões era significativamente menor em camundongos tratados com ST1898 a 0,1% com relação aos camundongos tratados com ST1898 a 0,05% (p valor < 0,005). ST1898 a 0,1% e adapaleno a 0,1% mostraram um efeito comparável (p valor = 0,288626).

Perfil de comedão. A análise do perfil de comedão mostrou um aumento altamente significativo e comparável no valor r em camundongos tratados com ST1898 a 0,1%, ST1898 a 0,05% e adapaleno com relação aos camundongos de controle não tratados e tratados com veículo (p valor < 0,0005). Esses dois últimos grupos mostraram valores comparáveis.

Espessura da epiderme. A espessura da epiderme era significativamente aumentada em camundongos tratados com ST1898 a 0,1%, ST1898 a 0,05% e adapaleno com relação a ambos os grupos de camundongos de controle (p valor < 0,0005). Camundongos não tratados e tratados com veículo mostraram valores comparáveis. A espessura da epiderme era maior em camundongos tratados com ST1898 a 0,05% quando comparado com camundongos tratados com ST1898 a 0,1% (p valor < 0,05) ou adapaleno (p valor < 0,005). Camundongos tratados com adapaleno mostraram uma epiderme significativamente mais espessa quando comparado com camundongos tratados com ST1898 a 0,1% (p valor < 0,05).

25 Conclusão

A análise de camundongos rhino topicamente tratados com o retinóide ST1898 durante 3 semanas consecutivas (uma vez por dia durante 5 dias/semana) revelou que ST1898, em ambas as concentrações usadas (0,1% e 0,05%), mostrou atividade comedolítica e anticomedogênica, conforme avaliado por (i) o número altamente reduzido de comedões comparado com os camundongos não tratados ou tratados com veículo e (ii) o forte aumento em comedões estreitos (valor aumentado de r).

ST1898 exerceu um efeito similar àquele estimulado pelo composto de referência, adapaleno, sobre o número e perfil de comedões, quando administrados na mesma concentração (0,1%).

O efeito do ST1898 era dose-relacionado, sendo ST1898 a 0,05% menos eficaz do que ST1898 a 0,1% na redução do número de comedões e na indução de hiperplasia epidérmica.

Além disso, hiperplasia epidérmica foi significativamente reduzida após tratamento tópico com ST1898 a 0,1% quando comparado com o tratamento com composto de referência, mostrando uma possível vantagem no uso de ST1898 com relação aos retinóides tópicos presentemente disponíveis.

Tabela 2

Peso corporal e Letalidade de Camundongos Rhino Tratados com ST1898 (Formulação 2) ou Adapaleno de Acordo com o Esquema qdx5/wx3w

Tratamento	n	Peso corporal inicial	Peso corporal final gr \pm SE	Perda Max. de peso gr \pm SE
Controle (não tratado)	*5	20,7 \pm 1,3	22,8 \pm 1,2	0
Veículo	*5	21,5 \pm 0,9	22,9 \pm 1,3	1
ST1898 a 0,1%	6	20,9 \pm 0,4	21,9 \pm 0,5	1
ST1898 a 0,05%	6	20,9 \pm 1,0	22,2 \pm 1,1	0
Adapaleno a 0,1% (gel Differin®)	*5	21,3 \pm 1,1	21,2 \pm 1,3	4

Os camundongos foram sacrificados 3 dias após o último tratamento. O veículo usado para ST1898 (Formulação 2) era o mesmo do gel Differin® (carbômero 980, propileno glicol, poloxâmero, edentato de sódio, metil hidroxibenzoato, fenoxietanol, hidróxido de sódio e água purificada).

*Um camundongo foi excluído do estudo antes de início de tratamento pelo baixo peso corporal.

Análise Morfométrica da Pele de Camundongos de Controle e Tratados com ST1898 (Formulação 2)

(resultados são expressos como valor médio \pm SD)

Tabela 3.1

Tratamentos	Comedões (n/cm)	P valor vs não tratados	P valor vs veículo
Não tratados	57,35 \pm 4,96		0,982154
Veículo	57,27 \pm 5,74	0,982154	
ST1898 a 0,1%	31,35 \pm 5,37	1,68 $\times 10^{-5***}$	2,89 $\times 10^{-5***}$
ST1898 a 0,05%	42,42 \pm 4,5	0,00056**	0,00098**
Adapaleno a 0,1%	28,31 \pm 2,92	3,41 $\times 10^{-6***}$	8,12 $\times 10^{-5***}$

P valor 0,1% ST1898 vs 0,05% ST1898 = 0,003182*

P valor 0,1% ST1898 vs adapaleno = 0,288626

- 5 P valor 0,05% ST1898 vs adapaleno = 0,000213***

Tabela 3.2

Tratamentos	Perfil de comedão (r = d/D)	P valor vs não tratados	P valor vs veículo
Não tratados	0,62 \pm 0,05		0,918704
Veículo	0,61 \pm 0,05	0,918704	
ST1898 a 0,1%	1,27 \pm 0,07	2,85 $\times 10^{-8***}$	2,99 $\times 10^{-8}$
ST1898 a 0,05%	1,26 \pm 0,13	3,24 $\times 10^{-6***}$	3,29 $\times 10^{-6***}$
Adapaleno a 0,1%	1,24 \pm 0,11	3,22 $\times 10^{-6***}$	3,23 $\times 10^{-6***}$

P valor 0,1% ST 1898 vs 0,05% ST1898 = 0,794536

P valor 0,1% ST1898 vs adapaleno = 0,517798

P valor 0,05% ST1898 vs adapaleno = 0,792654

- 10 Tabela 3.3

Tratamentos	Espessura epidérmica (μ m)	P valor vs não tratados	P valor vs veículo
Não tratados	20,90 \pm 2,91		0,857119
Veículo	20,56 \pm 2,86	0,857119	
ST1898 a 0,1%	45,52 \pm 2,17	1,80 $\times 10^{-7***}$	1,50 $\times 10^{-7***}$
ST1898 a 0,05%	37,45 \pm 3,97	2,94 $\times 10^{-5***}$	2,0 $\times 10^{-5***}$
Adapaleno a 0,1%	57,33 \pm 9,99	5,09 $\times 10^{-5***}$	4,72 $\times 10^{-5***}$

P valor 0,1% ST1898 vs 0,05% ST1898 = 0,020697*

P valor 0,1% ST1898 vs adapaleno = 0,006037*

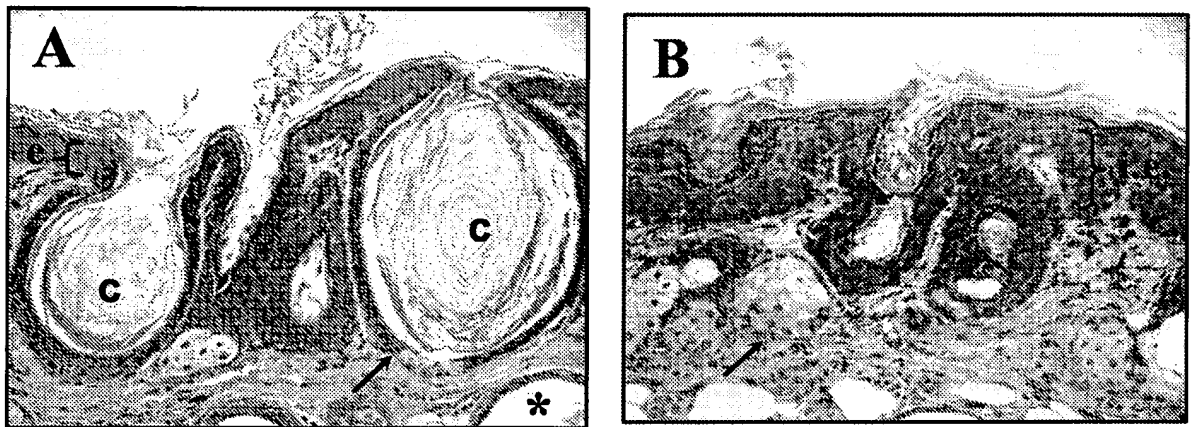
P valor 0,05% ST1898 vs adapaleno = 0,001479** *

= $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de ácido adamantil metoxidifenil propenóico para o preparo de um composto farmacêutico ou cosmético para uso tópico para o tratamento de acne.
- 5 2. Uso de acordo com a reivindicação 1, no qual o composto farmacêutico está na forma de gel.
3. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, contendo lecitina.
4. Uso de acordo com uma das reivindicações precedentes, contendo 0,1 mg de ácido adamantil metoxidifenil propenóico por 100 mg de gel.
- 10 5. Composto farmacêutico ou cosmético para uso tópico para o tratamento de acne contendo ácido adamantil metoxidifenil propenóico, como o princípio ativo, junto com outros excipientes e/ou veículos farmacêuticamente aceitáveis.
- 15 6. Composto de acordo com a reivindicação 5, na forma de gel.
7. Composto de acordo com as reivindicações 5 ou 6, contendo lecitina como o veículo ou excipiente.
8. Composto de acordo com as reivindicações 5 ou 7, contendo 0,1 mg de ácido adamantil metoxidifenil propenóico por 100 mg de gel.

FIG 1



IMAGENS MICROSCÓPIAS (20x): PELE DE CAMUNDONGO RHINO
A) NÃO TRATADOS
B) TRATADOS COM St1898

RESUMO

Patente de Invenção: **"USO DE ÁCIDO ADAMANTIL METOXIDIFENIL PROPENÓICO PARA O TRATAMENTO DE ACNE"**.

5 A presente invenção refere-se ao uso de uma substância pertencendo à classe de retinóides atípicos para o tratamento tópico de acne é descrito. Em particular, os efeitos sobre um modelo animal para essa doença de pele de um composto farmacêutico ou cosmético para uso tópico contendo ácido adamantil metoxidifenil propenóico formulado em um gel são demonstrados.