



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑤ Int. Cl.³: A 61 K 31/20

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein



⑫ FASCICOLO DEL BREVETTO A5

638 099

⑪ ②① Numero della domanda: 6906/77

⑦③ Titolare/Titolari:
Marcella Porro, Roma (IT)

②② Data di deposito: 01.01.1978
Date determinanti per la precedenza:
19.04.77; 03.06.77 (Art. 144 cpv. 2 LBI)

③⑩ Priorità: 19.04.1977 IT 22617/77

⑦② Inventore/Inventori:
Marcella Porro, Roma (IT)

②④ Brevetto rilasciato il: 15.09.1983

④⑤ Fascicolo del
brevetto pubblicato il: 15.09.1983

⑦④ Mandatario:
Bovard AG, Bern 25

⑤④ Composizione per il trattamento di dermatosi iperpigmentarie.

⑤⑦ Quale componente attivo la composizione contiene un acido dicarbossilico contenente da 7 a 13 atomi di carbonio oppure un suo derivato contenente nella molecola almeno un gruppo funzionale riducente. Per la preparazione del componente attivo nella forma di un mercaptoderivato si prepara il bromo derivato con un numero di atomi di bromo sostituenti pari al numero di mercaptogruppi da inserire, ed il bromo derivato viene portato a reagire con tiourea ed alcool etilico formando il sale di alchiltiuronio che, per saponificazione, forma il corrispondente mercaptoderivato. La composizione secondo la presente invenzione è applicabile topicamente sotto forma di creme, pomate, unguenti e lozioni. Le composizioni secondo la presente invenzione si sono in particolare dimostrate capaci di inibire la formazione del pigmento cutaneo (melanina), bloccando la reazione Dopa-tirosinasi con un meccanismo di tipo competitivo.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione per il trattamento di dermatosi iperpigmentarie o di iperpigmentazioni della pelle, utile per la terapia di dermatosi precancerogene e cancerogene, caratterizzata dal fatto che quale componente attivo contiene un acido dicarbossilico contenente da 7 a 13 atomi di carbonio oppure un suo derivato dove in uno o due gruppi carbossilici il gruppo idrossi è stato sostituito con un mercapto-gruppo.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1, caratterizzata dal fatto di essere in forma adatta per applicazione topica, od in forma iniettabile.
3. Composizione secondo la rivendicazione 1 o 2, caratterizzata dal fatto che detto componente attivo è acido azelaico.
4. Composizione secondo la rivendicazione 1 o 2, caratterizzata dal fatto che detto componente attivo è il mercaptoderivato dell'acido azelaico.
5. Procedimento per la preparazione del mercaptoderivato quale componente attivo della composizione secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che si prepara il bromoderivato con un numero di atomi di bromo uguale al numero di mercaptogruppi da inserire, mediante fusione dell'acido dicarbossilico con pentacloruro di fosforo e addizione di bromo anidro, si fa reagire il bromoderivato con tiourea e alcool etilico, formando il sale di alchiltiuronio, saponificando detto sale, formando così il mercaptoderivato.
6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che l'addizione di bromo avviene sotto agitazione ed a temperatura controllata a 60-70°C, procedendo quindi all'isolamento del bromo derivato.
7. Procedimento secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che la preparazione del monobromoderivato avviene portando a reagire 1 mole di acido con 50 grammi di PCl_5 e il relativo prodotto di reazione viene tratto con 60 ml di bromo anidro addizionato in piccole porzioni in un tempo di circa 6 ore.
8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che per la preparazione del dibromoderivato si raddoppia la quantità di bromo e si triplica il tempo di reazione.
9. Procedimento secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che nella preparazione del sale di alchiltiuronio, per l'ottenimento del mono-mercaptoderivato, si portano a reagire 1 mole di monobromoderivato con 50 ml di alcool etilico e 1,1 moli di tiourea.
10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che per la preparazione del dimercaptoderivato si ripete lo stadio della rivendicazione 9, adoperando per ogni mole di dibromuro quantità doppie rispettivamente di alcool etilico e tiourea.
11. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 8 a 10, caratterizzato dal fatto che la saponificazione viene effettuata con NaOH.

La presente invenzione concerne una composizione per il trattamento di dermatosi iperpigmentarie o di iperpigmentazioni della pelle, utile per la terapia di dermatosi precancerogene e cancerogene.

Le dermatosi come le iperpigmentazioni cutanee (che spesso determinano come nel caso dei cloasmi del volto un effetto deturpante), costituiscono un problema non soltanto di ordine estetico ma anche terapeutico che non ha trovato finora soluzione sostanziale.

Soltanto l'idrochinone ed i suoi derivati hanno dimostrato, finora, efficacia in vivo per il trattamento di iperpigmen-

tazioni cutanee, causando tuttavia, come effetto collaterale la comparsa di zone ipopigmentate durevoli, talvolta irriducibili.

Alla categoria delle dermatosi iperpigmentarie, ma con aspetti e conseguenze ben più gravi, appartengono alcuni stati patologici che vanno sotto il nome generico di dermatosi precancerogene e cancerogene (come stati premelanotici e melanomi). Anche per questa dermatosi non sono stati finora trovati rimedi efficaci.

Costituiscono l'oggetto della presente invenzione composizioni utili per gli scopi anzidetti, ossia capaci di riportare alla normalizzazione il colorito della pelle affetta da iperpigmentazione, come pure di arrestare e far regredire alcune forme di dermatosi pre-cancerogene e cancerogene.

La composizione secondo la presente invenzione si caratterizza per il fatto di contenere, quale ingrediente attivo, un acido dicarbossilico contenente da 7 a 13 atomi di carbonio oppure un suo derivato dove in uno o due gruppi carbossilici il gruppo idrossi è stato sostituito con un mercapto-gruppo.

La composizione secondo la presente invenzione, applicabile topicamente sotto forma di creme, pomate, unguenti e lozioni, contiene un acido dicarbossilico preferibilmente scelto nel gruppo comprendente gli acidi pimelico, suberico, azelaico, sebacico, 1,9-nonandicarbossilico, 1,10-decandicarbossilico e 1,11-undecandicarbossilico.

Le composizioni secondo la presente invenzione si sono in particolare dimostrate capaci di inibire la formazione del pigmento cutaneo (melanina), bloccando la reazione Dopa-tirosinasi con un meccanismo di tipo competitivo.

Senza voler porre limitazioni alla portata della presente invenzione e senza voler fornire una spiegazione tassativa del meccanismo d'azione del componente attivo della composizione della presente invenzione, sembra plausibile ricercare la causa della sua attività in un meccanismo analogo a quello riscontrato negli studi sperimentali condotti dalla Richiedente sul comportamento di un fungo, la *Pityrosporum orbiculare*, che è causa di una dermatosi che si manifesta con la comparsa di chiazze o macchie acromiche o biancastre, (Pitiriasi versicolore). Dall'osservazione, condotta in vitro ed in vivo, del comportamento di questo fungo è verosimile ritenere che lo stesso, metabolizzando gli acidi grassi normalmente presenti sulla pelle e necessari per la sua sopravvivenza e diffusione, provoca la formazione dei suddetti acidi dicarbossilici, ai quali appunto è dovuto il conseguente effetto di inibizione della melanogenesi.

A questo riguardo è degno di nota il fatto che anche dall'esame di colture di *Pityrosporum orbiculare*, addizionate con acido oleico tecnico come supplemento lipidico, è stata riscontrata la presenza, dopo saponificazione, degli acidi pimelico, azelaico ed 1,9-nonandicarbossilico (C_{11}), identificati mediante gascromatografia e spettrometria di massa.

I termini C_9 e C_{11} della serie degli acidi dicarbossilici hanno mostrato in vitro una rilevante attività anti-tirosinasi, che è stata del resto riscontrata anche nei termini ad 8, 10 e 12 atomi di carbonio.

Dallo studio del meccanismo di azione degli acidi precedentemente indicati si è inoltre giunti alla formulazione e sintesi di derivati dotati di maggior attività di inibizione sulla reazione Dopa-tirosinasi, tra cui i principali sono i mercaptoderivati.

Costituiscono pertanto un ulteriore aspetto della presente invenzione i derivati degli acidi dicarbossilici contenenti da 7 a 13 atomi di carbonio nella loro molecola e caratterizzati dal contenere almeno un gruppo riducente, preferibilmente un mercaptogruppo.

Considerando più specificamente la preparazione di questi derivati, l'esempio che segue intende illustrarla.

a) *Preparazione dell'alfa-monobromoderivato.*

In una beuta da 3 litri, posta su di un agitatore magnetico dotato di piastra riscaldante, si carica una mole di acido dicarbossilico (ad esempio acido azelaico) e si aggiungono 500 grammi di pentacloruro di fosforo. Avvenuta la reazione (fusione completa) si aggiungono, in piccole porzioni ed in circa 6 ore, 60 ml di bromo anidro, agitando continuamente. La temperatura di reazione viene controllata a 60-70°C.

Terminata la reazione, si raffredda e si aggiungono con cautela 500 ml circa di acqua distillata; si scalda quindi su agitatore magnetico per circa 30 minuti e si raffredda.

La fase organica inferiore, costituita da un liquido oleoso di colore giallo scuro, costituisce il monobromoderivato grezzo che viene distillato sotto vuoto.

b) *Preparazione del mercaptoderivato.*

In un pallone da 2 litri, dotato di refrigerante, si carica sotto cappa 1 mole di alfa-monobromoderivato; quindi si aggiungono 50 ml di alcool etilico a 95°C ed 1,1 moli di tiourea. La miscela viene portata a ricadere per sei ore, dopo di che, per raffreddamento, si separa il sale di alchiltiuronio.

Per la saponificazione di questo sale si aggiungono alla miscela 500 ml di NaOH 5 N e si bolle a ricadere per altre 2 ore. La miscela di reazione, raffreddata, viene acidificata con HCl 5 N, e, dopo agitazione per circa 10 minuti, si forma uno strato oleoso che viene separato. Lo strato acquoso viene estratto tre volte con etere etilico e tale estratto etereo viene aggiunto allo strato oleoso precedentemente separato, procedendo quindi all'essiccamento su Na_2SO_4 anidro. Dopo allontanamento dell'etere per distillazione, il mercaptoderivato grezzo viene purificato su colonna contenente gel di silice.

Per la preparazione dei dimercaptoderivati si ripete la procedura dell'esempio precedente, con le seguenti variazioni:

1. Si prepara il dibromoderivato dell'acido dicarbossilico allo stesso modo del monobromoderivato, raddoppiando però la quantità di bromo aggiunto e triplicando i tempi di reazione; la temperatura di reazione viene controllata a 90-100°C.

2. Nella fase di preparazione del mercaptoderivato si adoperano per ogni mole di dibromuro quantità doppie rispettivamente di alcool, di tiourea e di soda.

Allo scopo di valutare l'attività delle composizioni secondo la presente invenzione e quindi dei rispettivi ingredienti attivi, sono state effettuate sperimentazioni farmacologiche nonché prove in vivo.

Dagli estratti lipidici (cellulari e del filtrato) combinati, di colture di *Pityrosporum orbiculare* (ceppo 4709) coltivato per 20-30 giorni su un mezzo sintetico convenzionale, addizionato di acido oleico, si è ottenuta una porzione saponificabile avente rilevante attività di inibizione della tirosinasi. Sottoponendo questa porzione a cromatografia su strato sottile (TLC), è stata isolata una frazione, avente $R_f = 1,3$, capace di inibire la reazione Dopa-tirosinasi.

L'analisi gascromatografica e la successiva analisi mediante spettrometria di massa hanno messo in luce la presenza, in questa frazione, di una serie di acidi dicarbossilici

da C_5 a C_9 , con prevalenza quantitativa degli acidi pimelico ed azelaico.

Da una prova comparata con l'ausilio di campioni di acidi puri, è stato possibile escludere attività inibente della tirosinasi per l'acido glutarico (C_5), mentre tale attività diventava non trascurabile a partire dal termine C_7 con un massimo per i termini C_9 e C_{11} .

In particolare le prove di cinetica enzimatica hanno mostrato che l'acido azelaico è un inibitore competitivo della tirosinasi con $\text{unKi} = 4.10^{-4}\text{M}$.

Considerando ora le applicazioni in vivo delle composizioni della presente invenzione, sono stati condotti i seguenti esperimenti:

— una crema a base di acido azelaico è stata applicata 15 per 30 giorni alle macchie scure dei seguenti soggetti:

- 20 pazienti affetti da cloasma;
- 3 pazienti affetti da poichiloderma di Civatte;
- 1 paziente affetto da melanosi circoscritta precancerosa di Dubreuilh (lentigo maligna).

20 Tutti i pazienti, alla fine del trattamento, mostravano un visibile schiarimento delle zone iperpigmentate, e nella maggioranza si otteneva una guarigione apparentemente completa, senza effetti collaterali. Dopo 5 mesi di osservazione, nessuno dei pazienti trattati mostrava tracce di leu-

25 coderma.
Non sfuggirà all'attenzione che la melanosi circoscritta precancerosa rientra nella categoria delle dermatosi precancerogene. Di importanza fondamentale è il fatto che in questo paziente si è riscontrata non soltanto la guarigione clinica ma anche quella istologica.

Per quanto concerne invece la terapia del melanoma, gli esperimenti sono stati finora limitati agli animali da laboratorio e condotti nel modo seguente.

Campioni di melanoma di Harding-Passey sono stati prelevati da topi infetti e innestati in piccoli frammenti nel tessuto subcutaneo del fianco sinistro di topi Balb's C. Gli animali sono stati divisi in due gruppi di 30 topi ciascuno, uno dei quali è stato trattato giornalmente per via intraperitoneale iniettando una sospensione salina contenente 2 mg di 40 acido α -mercaptoazelaico. Gli animali di controllo venivano trattati iniettando 0,1 ml di soluzione salina allo 0,9%. Il trattamento è stato continuato fino alla morte dei controlli, effettuando quindi controlli istologici sia del melanoma degli animali trattati che di quello degli animali di controllo.

45 Le conclusioni preliminari che si possono trarre da questa sperimentazione sono le seguenti:

- la sopravvivenza media degli animali trattati con la sospensione contenente l'acido azelaico risulta prolungata;
- si nota un ritardo iniziale notevole dello sviluppo del 50 melanoma negli animali trattati;
- in alcuni degli animali trattati il melanoma risulta considerevolmente ridotto come grandezza ed estensione;
- in altri animali trattati in luogo del tumore si nota la formazione di una crosta nera od anche la mancata comparsa del melanoma.

Infine dagli esami istologici è stata constatata, negli animali trattati, la presenza di ampie zone necrotiche.

Esperimenti condotti mediante somministrazione per via intraperitoneale di acido azelaico puro sciolto nel suo dimetil- 60 estere hanno dato risultati promettenti.