

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 322**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64 (2006.01)

C07C 323/60 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2011 E 11368025 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2431356**

54 Título: **Peptidomiméticos derivados de la metionina y su utilización en la protección de las mitocondrias de las células cutáneas**

30 Prioridad:

17.09.2010 FR 1003708

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

03.03.2014

73 Titular/es:

**EXSYMOL S.A.M. (100.0%)
4 Avenue Albert II
98000 Monaco, MC**

72 Inventor/es:

SEGUIN, MARIE-CHRISTINE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 445 322 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Peptidomiméticos derivados de la metionina y su utilización en la protección de las mitocondrias de las células cutáneas.

La invención se refiere a una selección de peptidomiméticos derivados del aminoácido metionina, y a su utilización como agente protector de las mitocondrias de las células cutáneas. La invención se refiere asimismo a las composiciones destinadas a prevenir o a luchar contra los desórdenes cutáneos asociados a una disfunción mitocondrial.

Organito citoplásmico presente en las células vegetales y animales, la mitocondria juega un papel primordial para estas últimas. En efecto, las mitocondrias se presentan como las "centrales energéticas de nuestras células", con la producción y el almacenamiento de adenosina trifosfato (ATP), componente energético universal necesario para el funcionamiento de cualquier célula eucariota.

El comburente, necesario para dicha producción a través de un conjunto de reacciones químicas de oxido-reducción comúnmente llamada "cadena respiratoria mitocondrial", es el oxígeno. El oxígeno es por lo tanto indispensable para el funcionamiento celular, pero paradójicamente, es también la fuente inicial y paralela de especies reactivas llamadas "especies reactivas derivadas del oxígeno" (ERO en francés, ROS en inglés) potencialmente tóxicas para las macromoléculas bioquímicas de la célula (ADN, proteínas, lípidos, etc.).

Para neutralizar esta formación de ROS, cualquier célula desarrolla naturalmente unos sistemas de defensa antioxidantes, enzimáticos o no, que requieren energía para su puesta en servicio, en primer lugar justamente esta ATP procedente de la cadena respiratoria mitocondrial (Singh K.K., FEMS Yeast Res., 2004, vol. 5, pp. 127-132). Ahora bien, cuando se produce un desequilibrio entre producción y eliminación de las ROS por los sistemas de defensa intracelular en beneficio de cantidades que se han convertido en demasiado intensas, el estrés oxidante resultante engendra entonces progresivamente un declive de las funciones mitocondriales, expresado en particular por una desregulación del flujo de electrones productor de energía y la formación de ROS en el mismo interior de la mitocondria, llamadas "ROS intra-mitocondriales" (Jones D.P., Chemic Biological Comm., 2006, vol. 163, pp. 38-53). Dicho desequilibrio y déficit de energía al nivel de la célula comprometen la capacidad de ésta para adaptarse a los estreses fisiológicos a los cuales está expuesta, contribuyendo *in fine* al fenómeno de envejecimiento celular (Trifunovic A., *et al*, J. of Internal Médecine, vol. 263, pp. 167-178). Se establece también que estas desregulaciones de origen mitocondrial están implicadas claramente en la génesis de un amplio espectro de patologías o desórdenes tisulares (Barlow-Stewart K., The Australasian Genetics Ressource Book, 2007, pp. 1-3, y referencias citadas).

Fuente de ROS intracelular, la mitocondria es su principal blanco. En consecuencia y para preservar lo mejor posible la integridad funcional y/o estructural de cualquier mitocondria, una de las preocupaciones actuales de numerosos investigadores es intentar reducir el metabolismo oxidativo de origen mitocondrial y estimular o proteger las funciones de la mitocondria.

En el estado de la técnica mostrada estos últimos años con los mismos objetivos, las estrategias y sistemas considerados se han dividido a menudo entre:

- la selección de antioxidantes potentes portadores de uno o varios motivos tioles o fenoles, y encontrados en el estado natural en los reinos animal o vegetal, como el ácido tióctico más conocido con el nombre de ácido alfa-lipoico, con beneficios demostrados contra el envejecimiento mitocondrial (Palaniappan A.R. *et al*, Neurochem. Res., 2007, vol. 32, pp. 1552-8), o también la ergotioneína, derivado tiourea anunciado para proteger las membranas de las mitocondrias de mamíferos (patente US n° 6.479.533),
- la utilización de ciertas moléculas o proteínas antioxidantes convencionales, modificadas sin embargo por la adición/injerto de grupos o secuencias (catión hidrófobo, etc.) con alta afinidad por la mitocondria y por una mayor acumulación en ella (Kagan V.E. *et al*, Adv. Drug Delivery Rev., 2009, vol. 61, pp. 1375-85),
- el desarrollo de pequeños péptidos anunciados "cell-permeable" alternando residuos de aminoácidos aromáticos y básicos, debido a su capacidad para penetrar la membrana interna mitocondrial y exprimir luego propiedades de cito- y mitoprotección (Szeto H.H., Antioxidants & Redox Signaling, 2008, vol. 3, pp. 1-15).

La presente invención ha sido desarrollada en un mismo contexto de identificación de nuevos productos o nuevas preparaciones para responder a la demanda general de "mejorar el funcionamiento de las mitocondrias" (B. Lacroix, Nutranews, Abril 2008), con fines sin embargo cosméticos y/o dermatológicos con la administración de estos productos o preparaciones principalmente por vía tópica cutánea y con los objetivos concomitantes siguientes:

- preservar/restaurar una actividad metabólica eficaz de las mitocondrias de las células de la piel cuando estas últimas están afectadas fisiológicamente;
- presentar una biodisponibilidad aceptable en las capas profundas de la piel. Por un lado, se admite que se

trata de un pre-requisito esencial para una protección *in vivo* de las mitocondrias de las células cutáneas. Por otro lado, es útil evitar una metabolización demasiado precoz en las capas superiores de la piel incluso antes de poder actuar sobre las células epidérmicas y dérmicas;

- 5 - oponerse a los efectos deletéreos de especies reactivas derivadas del oxígeno con respecto a estas mismas células, tanto ROS de formación intra-mitocondrial como de origen extracelular (radiaciones ultravioletas, contaminación, toxinas ambientales oxidantes, etc.).

10 Para alcanzar estos objetivos, el solicitante se ha interesado en los compuestos tioéteres a los cuales se les atribuye una capacidad para desactivar ("quenching") diversos estados excitados del oxígeno, $O_2^{\cdot-}$ y 1O_2 por ejemplo (Cohen S.G. y L., J. Am. Chem. Soc., 1975, vol. 97, pp. 5633-5634 y referencias citadas).

15 Se más particularmente ha interesado en el alfa-aminoácido azufrado metionina en el cual el átomo de azufre participa en una misma función tioéter (S-CH₃), a pesar de ciertas características relacionadas con la metionina contrarias a las finalidades buscadas: olor reconocido de los derivados tio-orgánicos poco apropiado con una utilización cosmética/dermatológica, bajo poder de penetración en la piel, y sobre todo la puesta en evidencia de ROS intra-mitocondriales y daños oxidativos del ADN mitocondrial engendrados por una suplementación alimentaria de metionina (Caro P. *et al*, Rev. Esp. Geriatr. Gerontol., 2009, vol. 44, pp. 194-199; Sanz A. *et al*, FASEB J., 2006, vol. 20, pp. 1064-1073). Además, es presumible para los péptidos de tipo oligometionina (dimetionina, trimetionina, etc.) una alta sensibilidad con respecto a las proteasas cutáneas.

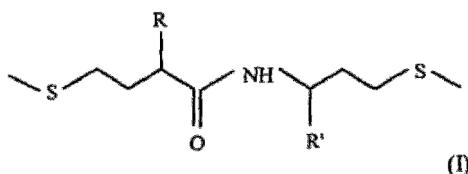
Es por eso en definitiva, que el solicitante orientó después sus investigaciones hacia la síntesis de peptidomiméticos derivados de la metionina.

25 Así, al final de una investigación estructura-actividad, la elección del solicitante se ha detenido en un panel limitado de compuestos originales derivados de la metionina, con respecto a su respuesta ventajosa a la combinación de criterios mencionados anteriormente y sin los inconvenientes atribuidos a la metionina o las oligometioninas, respuesta ventajosa ilustrada por:

- 30 - una excelente capacidad para mantener la actividad metabólica de células cutáneas expuestas a un estrés, reflejada por una preservación de los niveles de producción de ATP [véase el ensayo 1 a continuación];
- una absorción cutánea completamente favorable, yendo incluso más allá del estrato córneo, revelada por la obtención de un valor logarítmico de su coeficiente de permeabilidad ("Log Kp") comparable con la conseguida para compuestos permeantes tales como la cafeína [véase el ensayo 2 a continuación];
- 35 - una capacidad para reducir el estrés oxidativo mitocondrial, así como una capacidad para modular la masa mitocondrial (llamada "biogénesis mitocondrial") que se produce como respuesta a iguales condiciones de estrés [véase el ensayo 3 a continuación];
- 40 - una alta citoprotección, expresada en particular sobre un linaje celular de fibroblastos "V79" [véase el ensayo 4 a continuación] cuya característica es la de ser sensible al peróxido de hidrógeno H₂O₂ en el origen de desórdenes en la cadena respiratoria mitocondrial (Tatsumi T. *et al*, Basic Res. Cardiol., 1993, vol. 88, pp. 199-211);
- 45 - un fuerte perfil antioxidante traducido por una capacidad para secuestrar especies oxidantes conocidas por alterar las mitocondrias (radical hidroxilo OH[•], iones peroxinitritos ONOO⁻, oxígeno singlete ¹O₂), semejante a la de los antioxidantes de referencia tales como el ácido ascórbico o el Trolox™ [véanse los ensayo 5 y 6 a continuación];
- 50 - un ligero olor liberado por estos derivados de metionina.

La invención tiene por lo tanto como primer objeto una familia de peptidomiméticos derivados de la metionina, caracterizados porque está representada por la fórmula general (I) siguiente:

55

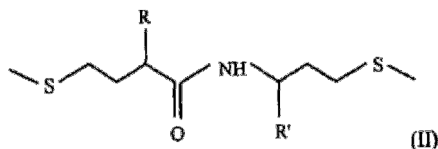


(I)
 $R = X-C(O)-NH-$ siendo X = alquilo o alquiloxi (C₁-C₈); R' = H
 $R' = -C(O)-OX$ siendo X = alquilo (C₁-C₈); R = H

60

Según un modo de realización preferido de la invención, la fórmula (I) se limita a la fórmula (II) siguiente en la que el radical R' es exclusivamente un átomo de hidrógeno y R es un radical en el que X es de tipo alquilo o alquiloxi con una longitud de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que comprende de uno a cuatro átomos de carbono (C₁-C₄):

5



R = X-C(O)-NH- siendo X = alquilo o alquiloxi (C₁-C₄); R' = H

10 Más ventajosamente, X en dicha fórmula (II) es de tipo alquilo con una longitud de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que comprende de uno a cuatro átomos de carbono (C₁-C₄).

A título de ejemplos no limitativos de compuestos de fórmula (II), se pueden citar en particular los compuestos siguientes:

15

- N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina
- N-propionil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina
- N-pentanoil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina
- N-t-butiloxi-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina

20

Según un modo de realización todavía más ventajoso de la invención, las fórmulas (I) y (II) mencionadas anteriormente señalan de manera particular el compuesto N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina (R = CH₃-C(O)-NH- y R' = H).

25 Según un segundo aspecto, la invención se extiende asimismo a una composición, preferentemente para uso cosmético o dermatológico, destinada a prevenir o a luchar contra los desórdenes cutáneos asociados a una disfunción mitocondrial, que comprende, en asociación con cualquier adyuvante fisiológicamente compatible con la piel, a título de ingrediente activo principal, un peptidomimético derivado de la metionina de fórmula general (I) tal como se ha definido anteriormente.

30

En el marco de la presente invención, se entiende por "ingrediente activo principal" una sustancia activa capaz de limitar las alteraciones funcionales o estructurales de las mitocondrias de células cutáneas sometidas a un estrés físico-químico o ambiental, por medio de un proceso de protección reforzada de las mitocondrias y/o de estimulación de algunas de sus funciones esenciales, tales como el metabolismo celular energético.

35

De manera muy particular, dicha composición está destinada a proteger la piel de un estrés inducido por las radiaciones ultravioletas (estrés UV-inducido), y el derivado de la metionina es de fórmula (II), más particularmente aún el compuesto N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina.

40 Ventajosamente, la cantidad de dicho derivado de fórmula general (I) en la composición anterior está comprendida entre el 0,1% y el 10% en peso con respecto al peso total de la composición, preferentemente entre 0,3% y 3% en peso.

45 Las composiciones según la invención, preferentemente para uso cosmético o dermatológico, están adaptadas a una administración por vía tópica cutánea, presentadas bajo cualquier forma utilizada normalmente para una administración de este tipo. De manera ventajosa, pueden presentarse en forma de un polvo, de una emulsión, de una micro-emulsión, de una nano-emulsión, de una suspensión, de una loción, de una crema, de un gel acuoso o hidroalcohólico, de una espuma, de un suero, de una solución o de una dispersión para aerosol, o de una dispersión de vesículas lipídicas.

50 Pueden ser formuladas también para una administración por vía oral (administración per os), en forma por ejemplo de comprimidos, cápsulas blandas, cápsulas, sobres, ampollas, jarabe, gotas.

55 Se puede citar, como ejemplo de adyuvante fisiológicamente compatible con la piel, un compuesto seleccionado de entre los aceites, las ceras, los elastómeros de silicona, los tensioactivos, los cotensioactivos, los espesantes y/o gelificantes, los humectantes, los emolientes, los filtros orgánicos, los filtros inorgánicos, los "booster" de filtros y los agentes fotoestabilizantes, los conservantes, los colorantes, las cargas, los nácares, los agentes matificantes, los agentes tensores, los secuestrantes, los perfumes y sus mezclas.

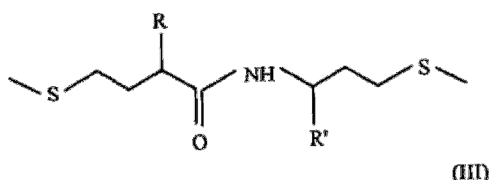
60 Dichos ejemplos, que pueden estar presentes en la composición a una concentración del orden de 0,01% al 20%

con respecto al peso total de la composición, están citados en particular en el diccionario "International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook" (13^a Edición, 2010), publicada por el "Personnal Care Product Council (PCPC, ex-CTFA)" de la asociación cosmética americana, y pueden ser (sin que esta lista sea limitativa): aceites de silicona, aceites sintéticos o de origen natural, hidrocarburos lineales o ramificados, ésteres y éteres de síntesis, ceras hidrocarbonadas, tensioactivos emulsionantes, alcoholes grasos lineales o ramificados, homo- y copolímeros reticulados o no, gomas, derivados celulósicos, alginatos, polioles, azúcares, glicosaminoglicanos y otros aminoácidos, cargas minerales u orgánicas, proteínas vegetales, polisacáridos, y sus mezclas.

Las composiciones según la invención pueden comprender además unos agentes activos adicionales, de tal manera que el efecto intrínsecamente vinculado a las composiciones según la invención no sea alterado por la adición prevista, en particular al menos un agente activo elegido de entre los agentes que estimulan la producción de factores de crecimiento, los agentes anti-glicación o desglucantes, los agentes que aumentan la síntesis de colágeno o que previenen su degradación, los agentes que aumentan la síntesis de elastina o que previenen su degradación, los agentes que aumentan la síntesis de glicosaminoglicanos o de proteoglicanos o que previenen su degradación, los agentes que aumentan la proliferación o la diferenciación de los queratinocitos, los agentes que aumentan la proliferación de los fibroblastos, los agentes despigmentantes, anti-pigmentantes o pro-pigmentantes, los agentes antioxidantes o anti-radicalarios o anti-contaminantes, los agentes que estimulan la hidratación y/o que protegen la función barrera de la piel, los agentes que aumentan la síntesis de lípidos epidérmicos, los agentes que estimulan la lipólisis, que inhiben la lipogénesis y/o que inhiben la diferenciación de los adipocitos, los agentes drenantes o detoxificantes, los agentes anti-inflamatorios, los agentes aceleradores de penetración, los agentes descamantes, los agentes aliviantes y/o anti-irritantes, los agentes astringentes, los agentes que actúan sobre la microcirculación, los agentes que actúan sobre el metabolismo de las células, y sus mezclas, y sin que esta lista sea limitativa.

Ejemplos de dichos activos adicionales pueden estar presentes en la composición en un contenido del orden de 0,001% a aproximadamente el 10% con respecto al peso total de la composición, y pueden ser elegidos en particular de entre extractos de planta, derivados de silicio, extractos de levadura y de algas, hidrolizados de proteínas vegetales, oligopéptidos acilados o no, extractos de café, la carcinina y sus derivados, la carnosina y sus derivados, la N-acetilcisteína y sus derivados, vitaminas hidrosolubles tales como las vitaminas B1, B2, B3, B6, B12, C, H, vitaminas liposolubles tales como las vitaminas A, D2, D3, E y caroteno, la urea y sus derivados, la taurina y sus derivados, polifenoles, oligo- y polisacáridos, los ácidos láctico, glicólico, cítrico y salicílico y sus ésteres o sales, y sus mezclas.

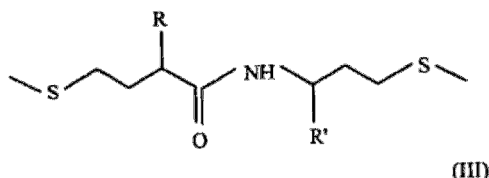
Otro objeto de la invención se refiere asimismo a la utilización de un peptidomimético derivado de la metionina como agente cosmético destinado a proteger y/o estimular las mitocondrias de las células cutáneas, siendo dicho derivado de fórmula general (III) siguiente:



R = X-C(O)-NH- siendo X = alquilo o alquiloxi (C₁-C₈); R' = H o -C(O)R" siendo R" = Oalquilo(C₁-C₄), NH₂

R' = -C(O)-OX siendo X = alquilo (C₁-C₈); R = H

Según un modo de realización preferido de la invención, dicho derivado es de fórmula general (III) siguiente:

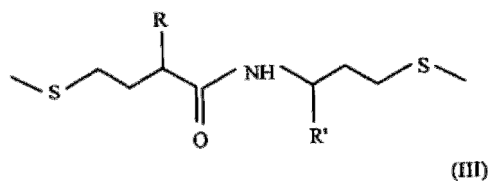


R = X-C(O)-NH- siendo X = alquilo o alquiloxi (C₁-C₈); R' = H o -C(O)R" siendo R" = Oalquilo(C₁-C₄), NH₂

Según un modo de realización ventajoso de la invención, se busca, con dicha utilización de dicho derivado, prevenir o luchar contra los signos cutáneos del envejecimiento, preferentemente contra los signos cutáneos del envejecimiento foto-inducido, en particular contra los daños causados a la piel por las radiaciones ultravioletas.

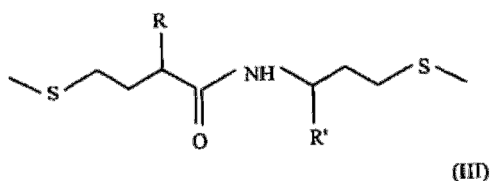
Un último objeto de la invención se refiere a un peptidomimético derivado de la metionina para su utilización en una composición dermatológica destinada al tratamiento de los signos cutáneos del envejecimiento, preferentemente

contra los daños causados a la piel por las radiaciones ultravioletas, siendo dicho derivado de fórmula general (III) siguiente:



- 5 R = X-C(O)-NH- siendo X = alquilo o alquiloxi (C₁-C₈); R' = H o -C(O)R'' siendo R'' = Oalquilo (C₁-C₄), NH₂
R' = -C(O)-OX siendo X = alquilo (C₁-C₈); R = H

10 Según un modo de realización preferido de la invención, dicho derivado es de fórmula general (III) siguiente:



R = X-C(O)-NH- siendo X = alquilo o alquiloxi (C₁-C₈); R' = H o -C(O)R'' siendo R'' = Oalquilo (C₁-C₄), NH₂

15 A título de ejemplos no limitativos de compuestos de fórmula (III), se pueden citar en particular los siguientes compuestos:

- N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina
- N-propionil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina
- N-pentanoil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina
- 20 - N-butiloxi-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina
- N-4-(metiltio)-butiril-L-metionina metiléster
- N-acetil-(DL)-metionil-metionina etiléster

25 En los dos últimos objetos de la invención tales como los mencionados anteriormente, se considera preferentemente un derivado de fórmula general (III) tal que R está limitado a un radical en el que X es de tipo alquilo que comprende de uno a cuatro átomos de carbono (C₁-C₄) y R' es exclusivamente un átomo de hidrógeno.

Preferentemente todavía, se ha seleccionado de manera muy particular el compuesto N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina.

30 **Ejemplo 1**

A título de ilustración, se menciona a continuación unos ejemplos de formulación de composición según la invención, que contiene un derivado de dicha fórmula general (I):

35 Fórmula A (crema)

N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina	1%
Poliisobuteno hidrogenado	7%
40 Miristato de isobutilo	3%
Palmitato de cetilo	7%
Monoestearato de etilenglicol	5%
Laurato de sorbitán	2%
Polisorbato 20	2%
45 Carbómero (copolímero de acrilato/acrilamida & aceite mineral)	0,3%
Fenoxietanol	0,5%
Benzoato de sodio	0,2%
Agua	csp 100%

50 Formula B (gel)

N-t-butiloxi-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina	3%
--	----

	Carbómero (copolímero de acrilato/acrilamida & aceite mineral)	1,5%
	Benzoate de sodio	0,2%
	Ácido sórbico	1%
5	1,3-butanodiol	10%
	Glicerina	5%
	Sosa cáustica	0,13%
	Fenoxietanol	0,9%
	Agua	csp 100%

10 Formula C (cápsula blanda, administración per os)

N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina (200 mg polvo/cápsula blanda), o
 N-4-(metiltio)-butiril-L-metionina metiléster (200 mg polvo/cápsula blanda)
 Excipientes csp 1 cápsula blanda en gelatina: celulosa microcristalina, estearato de magnesio.

15 **Ejemplo 2**

La invención se ilustra a continuación, a título puramente indicativo por los ensayos siguientes ya mencionados anteriormente en la descripción de la invención (ensayos 1 a 6). Se debe señalar asimismo que unos estudios *in vivo* realizados en el ser humano están en curso de realización y que los primeros resultados serán capaces de ilustrar la utilización de ciertos peptidomiméticos derivados de la metionina para los fines de la presente invención.

20 Ensayo 1: puesta en evidencia de la capacidad de peptidomiméticos derivados de la metionina para restaurar los niveles de ATP celular sobre las células objeto de un estrés (H₂O₂):

25 El estudio experimental ha sido realizado sobre un linaje celular de fibroblastos de tipo "V79" e inoculado en una placa de 96 pocillos a razón de 5000 células por pocillo en 100 µl de medio de cultivo (que contiene 10% de suero de ternera fetal). Éste se sustituye a continuación en cada uno de los pocillos por 100 µl de medio que contiene los peptidomiméticos según la invención, a la concentración de 7,5 mM o 10 mM. Después de 2 horas de incubación, el medio se retira sobre el conjunto de los pocillos, y las células son sometidas a continuación a un estado de estrés con la adición de un medio que contiene 50 µl de peróxido de hidrógeno H₂O₂ (4 ppm). Después de 8 nuevas horas de incubación, la concentración media en ATP se mide por luminometría en presencia de luciferina (kit "ATPlite 1step") y con la ayuda de una curva patrón preparada a partir de ATP muy purificado.

35 Los resultados, que reúnen los valores medios obtenidos a partir de tres experimentos independientes, se presentan en la tabla 1 siguiente, en comparación con un control.

Tabla 1

Compuesto	ATP (x10 ⁻⁷ M)
control	4,42
control + H ₂ O ₂	0,4
N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 7,5 mM	5,91
N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 7,5 mM + H ₂ O ₂	4,83
N-propionil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 10 mM	5,28
N-propionil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 10 mM + H ₂ O ₂	4,49

40 La caída masiva de la cantidad de ATP observada para el control se previene en gran medida en presencia de los compuestos según la invención, demostrando así su capacidad para restaurar la producción de ATP dentro de las células sometidas a un estrés.

45 Ensayo 2: estudio de absorción percutánea sobre explantes de piel humana de peptidomiméticos derivados de la metionina

Los valores de coeficiente de permeabilidad (Kp) han sido obtenidos sobre una piel humana procedente de una abdominoplastia previamente congelada, de acuerdo con el protocolo descrito en la línea directriz n^o 428 de la OCDE sobre la conducta de estudios de absorción cutánea.

50 Experimentalmente, los explantes de piel han sido puestos sobre una célula de Frantz en difusión pasiva, pilotados por el sistema "MicroettePlus Hanson Research", y los productos ensayados son aplicados de manera no oclusiva. Después de la colocación de la piel sobre las células, 500 µl del péptidomimético según la invención (solución al 1%) han sido depositados en cada una de las células y durante un tiempo de contacto total de 24 horas. Al término de éstas, se extrae el producto remanente y se seca la superficie de la piel para la extracción y medición de la cantidad absorbida, y después para la determinación del coeficiente de permeabilidad expresado en forma logarítmica (Log Kp).

Los resultados están reunidos en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2

5

Compuesto	Kp (cm·h ⁻¹)	Log Kp
cafeína	1·10 ⁻⁴ **	- 4,0
N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina	1,09·10 ⁻⁴	- 3,96
N-propionil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina	9,7·10 ⁻⁵	- 4,0
N-pentanoil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina	3,7·10 ⁻⁴ ***	- 3,43
N-t-butiloxi-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina	4,6·10 ⁻⁴ ***	- 3,34
N-4-(metiltio)-butiril-L-metionina metiléster	2·10 ⁻⁴ ***	- 3,71
N-acetil-(DL)-metionil-metionina etiléster	1,64·10 ⁻⁴ ***	- 3,78

** : Mitragotri S., J. Controlled Release, (2003), vol. 86, pp. 69-92
 ***: según el programa predictivo "ChemDraw ultra version 11.0", proveedor: CambridgeSoft Ltd

El coeficiente de permeabilidad obtenido por los compuestos según la invención es comparable al obtenido para la cafeína, reconocida permeante trans-*stratum corneum*.

10 Ensayo 3: puesta en evidencia del efecto protector del compuesto N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina sobre el estrés oxidante mitocondrial y sobre la biogénesis mitocondrial

Principios: las mediciones del estrés oxidativo intracelular mitocondrial y la detección de la biogénesis mitocondrial fueron realizadas por citometría de flujo con la ayuda de los marcadores fluorocromos siguientes:

15

- la sonda fluorescente roja "MitoSOXTM Red" designada a continuación "MitoSOX (detección a λ = 580 nm; proveedor: Invitrogen) permite detectar específicamente el anión superóxido O₂^{o-} presente en la mitocondria (debido a su fuerte afinidad por ésta),

20

- la sonda fluorescente verde "MitoTracker® Green FM" designada a continuación "Mitogreen" (detección a λ = 516 nm; proveedor: Invitrogen) permite cuantificar la masa mitocondrial (o número relativo de mitocondrias por célula).

25

Experimentalmente, las pruebas fueron realizadas sobre un linaje fibroblástico adherente de hámster "V79", mantenido por trasplante en un medio de cultivo completo "EMEM" (con 10% de suero de ternera fetal) en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Las células V79 se inoculan y a continuación se incuban 24 horas en placas de 6 pocillos a razón de 2,5·10⁵ células por pocillo en 3 ml del mismo medio de cultivo, y después son sometidas a un estado de estrés durante 1h 30 con la adición de un medio que contiene peróxido de hidrógeno H₂O₂ (15 ppm).

30

Después de tripsinación, las células se incuban a 37°C durante 15 minutos en 1 ml de medio de cultivo completo "EMEM" y que contiene dichos marcadores "MitoSOX" (a la concentración final de 5 μM) y "Mitogreen" (a la concentración final de 200 nM) para la detección respectiva:

35

- del estrés oxidante mitocondrial (expresado en % de células positivas),
- y de la masa mitocondrial por célula (expresada en % de MFI ("Mean Fluorescence Intensity") con respecto al control).

40

Los resultados, que reúnen los valores medios obtenidos a partir de cuatro experimentos independientes, se presentan en las tablas 3a y 3b siguientes, en comparación con los obtenidos para la N-acetil-cisteína escogida como agente protector de referencia a la concentración de 5 mM.

Tabla 3a

	% de células positivas con el MitoSOX
control	18
control + H ₂ O ₂	85,7
N-acetil-cisteína 5 ppm + H ₂ O ₂	15,2
N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 7,5 mM + H ₂ O ₂	40,3

45

Tabla 3b

	MFI (% control)
control	100
control + H ₂ O ₂	177,3

	MFI (% control)
N-acetil-cisteína 5 ppm + H ₂ O ₂	74,4
N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 7,5 mM + H ₂ O ₂	123,5
N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 10 mM + H ₂ O ₂	127,5

En los dos casos, los resultados subrayan para el compuesto N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina una capacidad para reducir el efecto del estrés intramitocondrial.

5 Ensayo 4: puesta en evidencia del efecto citoprotector de los peptidomiméticos N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina y N-t-butiloxi-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina:

10 El estudio experimental ha sido realizado sobre un linaje fibroblástico adherente de hámster "V79", mantenido en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂, e inoculado en las placas de 96 pocillos a razón de 0,5·10⁴ células por pocillo en 0,2 ml del medio de cultivo completo "EMEM" (con 10% de suero de ternera fetal). Las células son entonces sometidas 24 horas a un estado de estrés, tóxico, con la sustitución del medio de cultivo por un medio que contiene peróxido de hidrógeno H₂O₂ (4 ppm), medio al cual se añade simultáneamente el compuesto según la invención. Después de la eliminación del medio, se mide la viabilidad celular de los fibroblastos a través del "método con MTT" o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (solución a 500 µg/ml) y mediante espectrofotometría (absorbancia a 540 nm).

15 Los resultados, que reúnen los valores medios obtenidos a partir de tres experimentos independientes, están presentados en la tabla 4 siguiente, de nuevo en comparación con los obtenidos con la N-acetil-cisteína a 5 mM escogida como citoprotector de referencia (restauración total de una viabilidad celular).

20

Tabla 4

	% viabilidad celular
control	100
control + H ₂ O ₂	54,8
N-acetil-cisteína 5 mM	103,8
N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 7,5 mM + H ₂ O ₂	83,5
N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 10 mM + H ₂ O ₂	91,9
N-t-butiloxi-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 7,5 mM + H ₂ O ₂	70,1
N-t-butiloxi-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina 10 mM + H ₂ O ₂	77,3

25 Los resultados de la tabla 4 subrayan, para los compuestos según la invención, una viabilidad celular dosis-dependiente y una capacidad para proteger las células de un estrés citotóxico.

Ensayo 5: puesta en evidencia del efecto antioxidante de los peptidomiméticos N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina y N-propionil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina con respecto al radical hidroxilo

30 El método, descrito por Rehman A. *et al* (British J. Pharmacol. (1997), vol. 122, pp. 1702-1706) se utiliza para la determinación de la constante de velocidad de captura del radical hidroxilo [Ks(OH^o)], siendo el peptidomimético según la invención comparado con dos antioxidantes de referencia, el manitol y el ácido ascórbico (vitamina C).

35 Experimentalmente, se disuelve la sustancia ensayada en un medio tamponado a pH 7,4 al cual se añade un medio generador de OH^o (sistema ascorbato/hierro/EDTA) en presencia de desoxirribosa. Después de una hora de incubación a 37°C, la reacción se detiene con la ayuda de ácido tricloroacético. Después de la revelación colorimétrica con ácido tiobarbitúrico, se mide la absorbancia a 532 nm para diferentes concentraciones, y después se calcula el Ks (OH^o) relativo a cada una de las sustancias.

40 Los resultados se muestran en la tabla 5 siguiente.

Tabla 5

Compuesto	Ks(OH ^o) (10 ⁹ .M ⁻¹ .s ⁻¹)
ácido ascórbico	10,1**
manitol	1,6/1,9***
N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina	6,1
N-propionil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina	5,7

** : Cabelli D.E., J. Phys. Chem. (1983), vol. 87, pp. 1809-1812]
 *** : Rehman A., British J. Pharmacol. (1997), vol. 122, pp. 1702-1706]

45 Los resultados, que reúnen los valores medios obtenidos a partir de tres experimentos independientes, subrayan para los peptidomiméticos según la invención una capacidad para capturar el radical hidroxilo (OH) muy superior a la

del manitol, intermedia en comparación con la del ácido ascórbico.

Ensayo 6: puesta en evidencia del efecto antioxidante del compuesto N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina con respecto a los iones peroxinitritos

5 El método llamado "ensayo del blanqueo del Rojo de pirogalol (PR)", descrito por Nath V.B. *et al* (BBRC (2001), vol. 285, pp. 262-266) se utiliza para la determinación de la inhibición de la oxidación del rojo de pirogalol (PR) mediante unos iones peroxinitritos (ONOO⁻), siendo el compuesto N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina según la invención comparado con un antioxidante de referencia, a saber el "Trolox™" o ácido 2-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano carboxílico, equivalente hidrosoluble de la vitamina E.

10 Experimentalmente, en una placa de 96 pocillos, se añaden a la sustancia ensayada disuelta en un medio tamponado a pH 7,0, 50 µM de PR y 25 µM de iones peroxinitritos ONOO⁻ (en solución en NaOH 0,1 M). Después de 5 minutos, se mide la absorbancia mediante espectrofotometría a 540 nm, y se calcula a continuación el IC50 (concentración inhibitoria del 50%) relativo a cada una de las sustancias. Los resultados se muestran en la tabla 6 siguiente.

Tabla 6

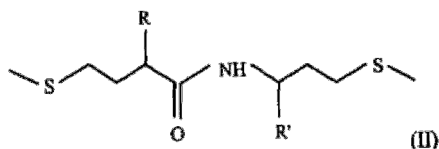
Compuesto	IC ₅₀ (mM)
Trolox	0,083
N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina	1,012

20 Menos activa que el antioxidante de referencia, la inhibición de la oxidación del PR por los iones peroxinitritos sigue siendo sin embargo claramente observada para el compuesto según la invención.

REIVINDICACIONES

1. Peptidomimético derivado de la metionina, caracterizado porque está representado por la fórmula general (II) siguiente:

5

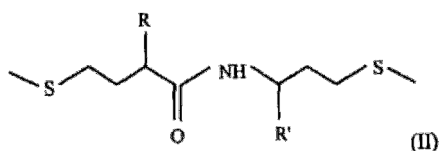


R = X-C(O)-NH- siendo X = alquilo o alquiloxi (C₁-C₄); R' = H

10 2. Peptidomimético según la reivindicación 1, caracterizado porque se trata del N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina.

3. Composición destinada a prevenir o a luchar contra los desórdenes cutáneos asociados a una disfunción mitocondrial, caracterizada porque comprende un peptidomimético derivado de la metionina de fórmula (II) siguiente:

15



R = X-C(O)-NH- siendo X = alquilo o alquiloxi (C₁-C₄); R' = H

20 4. Composición según la reivindicación 3, caracterizada porque dicho peptidomimético es el N-acetil-(DL)-metionil-4-(metiltio)propilamina.

5. Composición según una de las reivindicaciones 3 y 4, caracterizada porque la cantidad de dicho peptidomimético está comprendida entre el 0,1% y el 10% en peso con respecto al peso total de la composición.

25

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizada porque está adaptada a una administración por vía tópica cutánea, presentada en forma de un polvo, de una emulsión, de una microemulsión, de una nanoemulsión, de una suspensión, de una loción, de una crema, de un gel acuoso o hidroalcohólico, de una espuma, de un suero, de una solución o de una dispersión para aerosol, o de una dispersión de vesículas lipídicas.

30

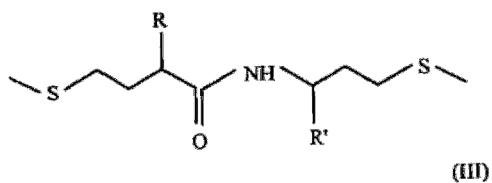
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizada porque comprende unos agentes activos adicionales seleccionados de entre los agentes que estimulan la producción de factores de crecimiento, los agentes anti-glicación o desglicantes, los agentes que aumentan la síntesis del colágeno o que previenen su degradación, los agentes que aumentan la síntesis de elastina o que previenen su degradación, los agentes que aumentan la síntesis de glicosaminoglicanos o de proteoglicanos o que previenen su degradación, los agentes que aumentan la proliferación o la diferenciación de los queratinocitos, los agentes que aumentan la proliferación de los fibroblastos, los agentes despigmentantes, anti-pigmentantes o pro-pigmentantes, los agentes anti-oxidantes o anti-radicalarios o anti-contaminación, los agentes que estimulan la hidratación y/o que protegen la función barrera de la piel, los agentes que aumentan la síntesis de lípidos epidérmicos, los agentes que estimulan la lipólisis, que inhiben la lipogénesis y/o que inhiben la diferenciación de los adipocitos, los agentes drenantes o destoxicantes, los agentes antiinflamatorios, los agentes aceleradores de la penetración, los agentes descamantes, los agentes aliviantes y/o anti-irritantes, los agentes astringentes, los agentes que actúan sobre la microcirculación, los agentes que actúan sobre el metabolismo de las células, y sus mezclas.

40

45 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, caracterizada porque está destinada a proteger la piel de un estrés "UV-inducido."

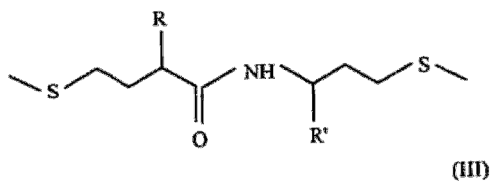
9. Utilización de un peptidomimético derivado de la metionina como agente cosmético destinado a proteger y/o a estimular las mitocondrias de las células cutáneas, siendo dicho peptidomimético de fórmula general (III) siguiente:

50



R = X-C(O)-NH- siendo X = alquilo o alquiloxi (C₁-C₈); R' = H o -C(O)R" siendo R" = Oalquilo (C₁-C₄), NH₂

- 5 10. Peptidomimético derivado de la metionina para su utilización en una composición dermatológica destinada al tratamiento de los signos cutáneos del envejecimiento, siendo dicho derivado de fórmula general (III) siguiente:



R = X-C(O)-NH- siendo X = alquilo o alquiloxi (C₁-C₈); R' = H o -C(O)R" siendo R" = Oalquilo (C₁-C₄), NH₂