

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 011**

51 Int. Cl.:

A41G 5/00 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/IB2012/056269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068964**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12806672 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2775874**

54 Título: **Composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de trastornos degenerativos de la piel especialmente producidos por radiaciones ionizantes**

30 Prioridad:

08.11.2011 IT PO20110021

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

24.04.2018

73 Titular/es:

**SOLOSALE S.R.L. (100.0%)
Piazza Donatello 3
50132 Firenze, IT**

72 Inventor/es:

**FEDELI, ENRICHETTA y
SERENSI, ILARIA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 665 011 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

Composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de trastornos degenerativos de la piel especialmente producidos por radiaciones ionizantes

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene derivados de S-acilo de glutatión con ácidos grasos insaturados, como se define en las reivindicaciones, utilizable para la prevención y el tratamiento de trastornos degenerativos cutáneos especialmente producidos por radiación ionizante, en particular por radiación ultravioleta del sol o artificial.

10

Técnica anterior

Es bien sabido que los radicales libres desempeñan una función importante en el envejecimiento y que nuestro cuerpo tiene estrategias de defensa contra radicales libres representados por un conjunto de sustancias y mecanismos antioxidantes, tales como vitaminas A, E y C y las enzimas superóxido dismutasa y catalasa. La defensa representada por el glutatión es la más eficaz, debido a su alta concentración intracelular.

15

La investigación farmacológica ha intentado ralentizar los efectos del tiempo sobre el envejecimiento de tejidos restaurando, al menos temporalmente, la ausencia de las sustancias clave requeridas por el cuerpo mediante la combinación sinérgica de tratamientos tópicos y suplementos nutricionales específicos, por ejemplo mediante el suministro de sustancias antioxidantes capaces de limitar el daño producido por los radicales libres.

20

Estudios recientes también han mostrado que en muchas enfermedades degenerativas tales como la diabetes, hepatitis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, disfunción renal, isquemia miocárdica, síndrome disneico del adulto y enfermedad de Alzheimer, la pérdida de células está relacionada con estrés oxidativo y con una reducción en los niveles de sustancias intracelulares con actividad antioxidante, en particular glutatión reducido (GSH).

25

El glutatión desempeña una función clave en la defensa celular actuando como un poderoso antioxidante debido a su alta capacidad de donante de electrones combinada con su alta concentración intracelular. Con el fin de mantener o restaurar un nivel adecuado de defensas antioxidantes celulares en tejidos afectados por el estrés oxidativo, se han desarrollado varias estrategias terapéuticas que pretenden aumentar los niveles de GSH mediante la ingesta, mediante la comida o fármacos, de precursores o miméticos de glutatión. En particular, el glutatión o los derivados del glutatión o su precursor la cisteína, tales como N-acetilglutatión y N-acetilcisteína, pueden encontrarse en muchas preparaciones comercialmente disponibles.

30

35

La solicitud PCT WO2009047728 describe el uso de derivados de S-acilo de glutatión. Estos tioésteres, en los que el resto de lípido está constituido de ácidos grasos de cadena larga, se usan en la preparación de composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento de enfermedades degenerativas asociadas a niveles reducidos de glutatión intracelular, tales como enfermedad de Huntington y enfermedad de Alzheimer.

40

Causas comunes del estrés oxidativo relacionadas con la reducción de los niveles de glutatión intracelular y con el envejecimiento incluyen agentes físicos y ambientales.

45

La piel, en particular, está sometida a procesos de envejecimiento celular, debido a la exposición al componente ultravioleta de la radiación solar, radiación ultravioleta de fuentes artificiales tales como lámparas de bronceado y otra radiación ionizante – rayos X, gamma, beta, alfa – de tanto fuentes naturales como artificiales.

Recientemente, se ha demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados (por ejemplo, ácidos alfa- y gamma-linoleicos, presentes abundantemente en el aceite de linaza) ejercen una acción estimulante sobre las macroestructuras de hidratación de la dermis que conducen a un efecto antienvjecimiento. Numerosos estudios también han descrito los efectos antienvjecimiento de compuestos que actúan de secuestrantes de radicales. Estas sustancias provocan actividad anti-radicales y normalmente son de origen natural, tales como flavonoides de ginkgo biloba, polifenoles de corteza de Hamamelis, resveratrol, licopenos, y muchos otros también ejercen una acción protectora sobre la microcirculación de la piel. Sin embargo, los anti-radicales libres más eficaces son las vitaminas antioxidantes y el selenio, que el cuerpo es incapaz de sintetizar directamente, sino que necesariamente deben ser ingeridos mediante la dieta.

50

55

Se sabe muy bien que la exposición de la piel al componente ultravioleta de la radiación solar, o a la luz ultravioleta producida por las lámparas de bronceado artificiales, aumenta significativamente la probabilidad de aparición de enfermedades de la piel, tales como melanoma, hiperqueratosis, angioectasias, fibroides, etc., además de determinar alteraciones de la piel antiestéticas relacionadas con procesos de envejecimiento fotoinducidos. Actualmente, la protección de los procesos de degeneración de la piel inducidos por la exposición a luz solar o a luz ultravioleta artificial se basa esencialmente en el uso de barreras físicas, tales como prendas, que previenen la interacción de la radiación ionizante con la piel, o en la aplicación sobre la epidermis de cosméticos que contienen

60

65

sustancias capaces de filtrar la radiación ultravioleta. Sin embargo, las prendas, aparte de casos muy especiales, protegen solo una fracción de la superficie total de la piel, mientras que el uso de protectores solares puede ser desventajoso en casos en los que se desea la estimulación de la síntesis de melatonina por los melanocitos para fines estéticos. Por otra parte, la exposición de la piel a la radiación solar va acompañada de otros efectos deseables, tales como la estimulación de la síntesis de vitamina D mediante la conversión de 7-dehidrocolesterol en colecalfiferol y el efecto de bronceado de la piel.

Se siente fuertemente la necesidad de soluciones que permitan que la piel se exponga moderadamente a la luz del sol o a luz ultravioleta artificial sin producir efectos secundarios no deseados tales como envejecimiento celular o enfermedades degenerativas de la piel.

Divulgación de la invención

En general, el objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que va a usarse para la prevención y el tratamiento de procesos degenerativos celulares de la piel producidos por agentes físicos y ambientales.

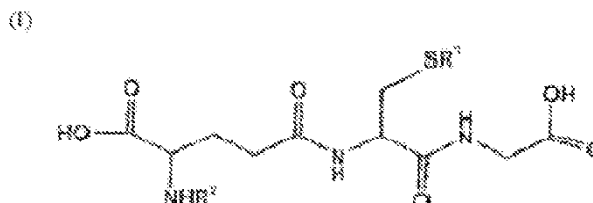
Más específicamente, es un fin de la invención proporcionar una composición farmacéutica, que contiene derivados de S-acilo de glutatión con ácidos grasos insaturados, para la prevención y el tratamiento de trastornos degenerativos de la piel producidos por exposición a radiación ultravioleta u otra radiación ionizante.

En particular, es objetivo de la invención proporcionar una formulación farmacéutica que contiene tioésteres de glutatión con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como se definen en las reivindicaciones y el uso de dicha formulación para facilitar la administración de sustancias con actividad antioxidante, que incluyen glutatión reducido, dentro de las células de la piel. También se desvela un nuevo método para la síntesis de derivados de S-acilo de glutatión, en particular tioésteres de glutatión con ácidos grasos insaturados de cadena larga, especialmente adecuados para producir composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento de estados degenerativos de la piel y envejecimiento celular producido por la exposición de la piel a radiación ionizante, en particular a radiación ultravioleta de fuentes naturales o artificiales.

Los fines anteriores se logran por medio de una composición según las reivindicaciones adjuntas.

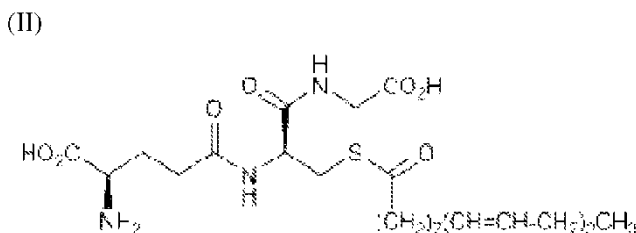
Mejor modo para llevar a cabo la invención

Según la invención, se proporcionan derivados de tioéster de glutatión que tienen la fórmula



en la que R¹ está seleccionado de radicales de ácidos linolénico, araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico y R² es hidrógeno o un grupo acilo alifático o aromático, preferentemente alifático, y lo más preferentemente un grupo acilo poliinsaturado C₁₈-C₂₄. En un modo particularmente preferido para llevar a cabo la invención, R₁ y R₂ son radicales seleccionados de aquellos de ácido linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico.

Aquí se muestra a continuación la fórmula estructural del tioéster de glutatión con ácido linolénico.



Debido a su naturaleza lipófila, los derivados de S-acilo y de S,N-diacilo de glutatión según la invención atraviesan fácilmente la membrana celular y dentro de la célula son enzimáticamente hidrolizados por esterases, liberando así el glutatión reducido y ácidos carboxílicos libres. La capacidad para atravesar membranas celulares debe atribuirse a la presencia de la cadena de hidrocarburo apolar de los grupos acilo unidos al grupo tiol o a los grupos tiol y amino

de glutatión.

Una composición farmacéutica según la presente invención comprende una mezcla de sustancias activas con actividad antioxidante, estando al menos una de ellas representada por un tioéster de glutatión con un ácido graso poliinsaturado de cadena larga como se ha especificado anteriormente, junto con agentes dotados de diferentes actividades tales como emulsionantes, conservantes, pigmentos, aromas, humectantes, etc. En particular, el tioéster de glutatión con un ácido graso poliinsaturado de cadena larga está contenido en la composición a una concentración que oscila entre 1 μ M y 100 mM, preferentemente entre 50 μ M y 5 mM.

Dos ejemplos de una composición farmacéutica tal se dan aquí a continuación. Es bien sabido que estos ejemplos representan solo dos de las posibles aplicaciones de la presente invención y no son limitantes de las mismas.

Ejemplo 1

linolenoil-S-glutatión
vitamina C
vitamina A
vitamina E
selenio

Ejemplo 2

eicosapentaenoil-S-glutatión
ácido glicólico
vitamina C
vitamina E
resveratrol
ácido hialurónico
lecitina
triacilglicerol

La eficacia de la formulación farmacéutica descrita en la presente invención se demuestra por los resultados obtenidos en fibroblastos cultivados expuestos a radiación ultravioleta. La incubación de estas células durante 3 h con la formulación que contiene S-acil-glutatión 100 μ M aumentó significativamente el contenido intracelular de glutatión reducido y produjo una supervivencia significativamente más alta en comparación con fibroblastos de control, como se muestra en la Tabla I:

Tabla I

Modelo de estudio	acil-S-glutatión	GSH intracelular, % en comparación con controles (3 h después de la incubación)	supervivencia celular, % (24 h después del fin de la irradiación)
fibroblastos de piel cultivados expuestos a rayos UV	ausente	30	10
fibroblastos de piel cultivados expuestos a rayos UV	oleil-S-glutatión	85	35
fibroblastos de piel cultivados expuestos a rayos UV	linoleil-S-glutatión	110	63
fibroblastos de piel cultivados expuestos a rayos UV	linolenoil-S-glutatión	115	97
fibroblastos de piel cultivados expuestos a rayos UV	S,N-di-linolenoil-S-glutatión	113	98

fibroblastos de piel cultivados expuestos a rayos UV	araquidonoil-S-glutación	115	100
fibroblastos de piel cultivados (control)	ausente	100	100

La eficacia de la formulación para determinar un aumento de GSH intracelular y de supervivencia celular tras la exposición a radiación ultravioleta fue tanto mayor cuanto más alto fue el número de átomos de carbono y el grado de insaturación del ácido graso unido a glutación, siendo los ácidos linolénico y araquidónico aparentemente los más eficaces. Experimentos similares llevados a cabo con el uso de ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico proporcionaron resultados similares a aquellos obtenidos con ácidos linolénico y araquidónico. La máxima eficacia de la formulación se observó cuando se usó conjugado de S-acil-glutación 100 μ M. Concentraciones más altas, hasta 50 mM, de conjugado no demostraron ser más eficientes en producir los efectos observados. Concentraciones más bajas mostraron una actividad proporcionalmente más pequeña que la presentada por las formulaciones que contienen conjugado 100 μ M, mientras que concentraciones inferiores a 0,5 μ M no demostraron poseer ninguna actividad.

Considerando que la concentración promedio de glutación en este tipo de células es aproximadamente 2 mM, el aumento de la concentración de glutación intracelular producida por el tratamiento con tioésteres de glutación a estas bajas concentraciones es en realidad sorprendente y difícilmente atribuible a la simple internalización de tioésteres de glutación por las células, sino a una estimulación de la síntesis endógena de glutación o a un mecanismo diferente de regulación de la expresión génica que afecta la renovación de enzimas implicadas en el metabolismo del glutación.

Experimentos similares llevados a cabo usando derivados de S,N-diacilo de glutación, en los que ambos ácidos grasos fueron poliinsaturados y cuyos átomos de carbono oscilaron entre 18 y 24, mostraron eficiencia similar a la provocada por los derivados de S-acilo de glutación.

Experimentos similares llevados a cabo usando compuestos antioxidantes distintos de derivados de S-acilo de glutación, tales como ácido ascórbico, vitamina E, Trolox®, resveratrol, a las mismas concentraciones, no produjeron efectos significativos, en términos de eficacia, para los fines de la presente invención.

En otros experimentos, la formulación descrita en el Ejemplo 2 se aplicó sobre la piel de sujetos adultos que habían concedido consentimiento informado. Después de una hora de irradiación con lámpara ultravioleta, el grado de eritema observado, medido por espectro-reflectometría, no fue significativamente diferente en comparación con los valores medidos en la misma área de piel, antes del tratamiento. De otro modo, la diferencia fue altamente significativa en sujetos de control, en cuya piel no se había aplicado la formulación.

Estos resultados justifican el posible uso de derivados de S-acilo de glutación según la presente invención para la preparación de composiciones farmacéuticas útiles para la prevención y el tratamiento de estados degenerativos de la piel y envejecimiento celular producidos por exposición de la piel a radiación ionizante, en particular radiación ultravioleta de fuentes naturales o artificiales.

Dichas composiciones farmacéuticas comprenden, como principio activo, un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, solos o en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como un vehículo o un diluyente.

Las composiciones se preparan preferentemente en una forma adecuada para administración por vía oral o para inyección. Los excipientes farmacéuticamente aceptables que se mezclan con el compuesto activo o sales de tal compuesto, para preparar las composiciones según la invención, son muy conocidos en sí mismos y su elección depende, entre otras cosas, del método prescrito para la administración de las composiciones.

Las composiciones para administración por vía oral pueden tomar la forma de comprimidos, comprimidos retardados, comprimidos sublinguales, cápsulas y similares, o elixires, jarabes o suspensiones, conteniendo todos un compuesto según la invención. Las composiciones para inyección pueden prepararse a partir de sales solubles, que pueden disolverse en un líquido apropiado para inyección parenteral. Composiciones para uso local pueden tomar la forma de cremas, geles, sueros, lociones y similares, conteniendo todos un compuesto según la invención. Todas las preparaciones mencionadas en el presente documento pueden producirse por métodos muy conocidos en el campo.

Los derivados de S-acilo de glutación según la invención pueden sintetizarse haciendo reaccionar glutación con derivados de benzotriazol de ácidos grasos.

Métodos para la síntesis bioquímica o química de tioésteres de glutación se describen en la bibliografía (Free Radical

Biology & Medicine 44 (2008) 1624-1636; Synlett 2010 (9): 1337-1340; Chem. Res Toxicol. 14:1033-1040, 2001; Bioorg. Med Chem. 15:1062-1066, 2007) y en el documento WO2009047728.

Los métodos disponibles hasta la fecha se caracterizan, sin embargo, por alto coste o rendimiento muy bajo o dificultades en la purificación del tioéster o producen sales del tioéster con aniones no utilizables con el fin de la presente invención y, por tanto, no son adecuados para la síntesis industrial de tioésteres de glutatión con ácidos grasos de cadena larga utilizables con el fin de la presente invención. Katritzky et al. (Synlett 2010 (9): 1337-1340) describen la síntesis de tioésteres de glutatión con compuestos aromáticos carboxílicos o con otros compuestos carboxílicos, pero no con ácidos grasos de cadena larga.

El método aquí descrito es óptimo para la producción industrial de glutatión con tioésteres de ácidos grasos con varios átomos de carbono entre 12 y 24, ya sean saturados o insaturados o poliinsaturados, y garantiza la producción de productos con alto grado de pureza, superiores al 98 %, usando reactivos fácilmente disponibles y de bajo coste. Además, una ventaja significativa de la síntesis orgánica aquí descrita se representa por el rendimiento, es decir, la cantidad de producto obtenible en comparación con la cantidad de reactivos usados, que parece ser entre el 60 y el 99 % dependiendo de la naturaleza del ácido graso.

Aquí a continuación se describe la síntesis de una forma esquemática:

A)

CH₂Cl₂, TA

ácido graso + benzotriazol + SOCl₂ -----→ N-acilbenzotriazol

B)

NaHCO₃, TA

N-acilbenzotriazol + GSH -----→ S-acil-glutatión + benzotriazol

MeOH / (CH₃)₂CO

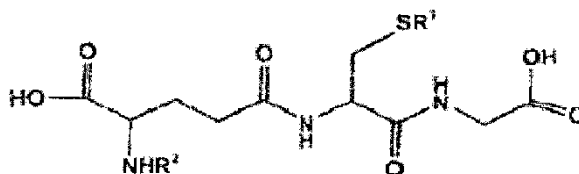
La síntesis de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo por expertos en la materia de diferentes formas, sin embargo, es particularmente ventajoso implementar la siguiente secuencia de fases, con el fin de obtener el producto con la pureza y rendimiento mencionados anteriormente:

- 1) Síntesis de N-acilbenzotriazol mediante reacción entre benzotriazol, cloruro de tionilo y ácido graso en cloruro de metileno.
- 2) Síntesis a temperatura ambiente de S-acil-glutatión mediante adición de dos equivalentes de HCO³⁻ con un equivalente de N-acilbenzotriazol y un equivalente de glutatión, en metanol/acetona.
- 3) Ajuste del pH, preferentemente con ácido acético o ácido fosfórico, a valores entre 4 y 2,5 y filtración del precipitado.
- 4) Lavado del precipitado con agua y disolvente orgánico, preferentemente acetato de etilo.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de trastornos degenerativos de la piel y del envejecimiento celular producidos por exposición de la piel a radiación ionizante, en particular a radiación ultravioleta solar o artificial, que comprende al menos un tioéster de glutatión con un ácido graso como principio activo, que tiene la siguiente fórmula

(I)



- 10 en la que R1 está seleccionado de radicales de ácidos linolénico, araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico y R2 es hidrógeno o un grupo acilo alifático o aromático.
2. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que R2 es un grupo poliinsaturado C18-C24.
- 15 3. Una composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tioéster de glutatión está contenido en una concentración de entre 1 µM y 100 mM, preferentemente entre 50 µM y 5 mM, siendo 100 µM la concentración óptima.
- 20 4. Una composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende, como principio activo, un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo solos o en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como un vehículo o un diluyente.
- 25 5. Una composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, preparada en una forma adecuada para administración por vía oral o para inyección o localmente aplicable.