

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 400 517**

(51) Int. Cl.:

**A61Q 19/08** (2006.01)  
**C07C 233/08** (2006.01)  
**A61K 8/42** (2006.01)  
**C07C 231/02** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2006 E 06799607 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1971571**

---

(54) Título: **Uso de la amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico en la fabricación de composiciones antienvejecimiento**

(30) Prioridad:

**20.10.2005 PL 37774705**

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

**10.04.2013**

(73) Titular/es:

**INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ PAN  
(100.0%)  
UL. Z. NOSKOWSKIEGO 12/14  
61-704 POZNAN, PL**

(72) Inventor/es:

**BARCISZEWSKI, JAN;  
RYCHLEWSKI, LESZEK;  
CELEWICZ, LECH;  
CISZEWSKI, KRZYSZTOF;  
WYSZKO, ELIZA y  
ROLLE, KATARZYNA**

(74) Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

**ES 2 400 517 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

Uso de la amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico en la fabricación de composiciones antienvejecimiento

- 5 Dado que la floretamida posee una serie de propiedades biológicas, podría usarse como composición para la piel que tiene un efecto antienvejecimiento excelente para prevenir la flacidez de la piel y la pérdida de brillo.
- 10 La amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico (floretamida) posee una serie de propiedades biológicas. Los compuestos de baja masa molecular en jugos de plantas desempeñan un papel muy significativo en el crecimiento y el desarrollo de brotes de plantas. Se ha demostrado que el fruto de *Malus domestica* (cv. Lobo) contiene amida del ácido 3-(p-hidroxifenil)propanoico, también denominada floretamida (n.º CA 23838-70-2). Se identificó con la ayuda de espectrometría de masas y espectroscopía de RMN. El punto importante es que el jugo de planta secretado tiene una concentración muy superior de floretamida que los jugos de plantas internos [H. Rybicka Phloretamid in fruitlets of apple tree (*Malus domestica*), [www.app-oline.pl](http://www.app-oline.pl), Acta Physiologiae Plantarum, vol. 18/1996, pág. 359].
- 15 Compuestos estructuralmente similares, tales como ácidos hidroxicinámicos son algunos de los principales compuestos fenólicos que se producen en plantas. En particular, el ácido p-hidroxicinámico es un componente común que se produce en plantas superiores [Bearder, J.R. Plant hormonem and Rother growth substances - their background, structures and occurrence. Encycl. Plant Physiol., New ser., vol. 9.. 9-112, Springer Verlag, Berlín-Heidelberg-Nueva York, 1980; Harbonc J.B. Plant phenolics, Encycl. Plant Physiol., New ser., vol. 8, 329-402,
- 20 Springer Verlag, Berlín-Heidelberg-Nueva York, 1980; Herrmann, K. Hydroxyzimtsaeure und Hydroxybenzoësaeure enthaltende Naturstoffe in Pflanzen, Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe 35, 73-132 (1978)]. Se determinó que las amidas secundarias de ácidos hidroxicinámicos se producen de manera prolífica en las flores fértiles de Araceae, mientras que no se encontraron en flores esterilizadas [Ponchet M., Martin-Tanguy J., Maras A., Martin C. Hydroxycinnamoil acid amides and aromatic amines in the inflorescences of some Araceae species, Phytochemistry 21,2865-69, 1982]. Además, se encontró la presencia de diácidos hidroxicinámicos en determinadas plantas [Harbone J.B. Plant phenolics, Encycl. Plant Physiol., New ser., vol. 3, 329-402, Springer Verlag, Berlín-Heidelberg-Nueva York, 1980; Herrmann, K. Hydroxyzimtsaeure und Hydroxybenzoësaeure enthaltende Naturstoffe in Pflanzen, Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe 35, 73-132 (1978)]. Concretamente se ha encontrado ácido florético (ácido dihidro-p-hidroxicinámico, ácido 3-[p-hidroxifenil]-propanoico) en puntas de raíz. La presencia de floretamida en fluido de xilema (jugo de planta leñosa) que se libera a presión por manzanos durante la floración es probable que desempeñe un papel significativo en su fisiología. Esto se apoya por la presencia de amidas secundarias de ácidos hidroxicinámicos en los tejidos reproductores de plantas [H. Rybicka 3-[p-hydroxyphenyl]-propionic acid amide (phloretamide) In root exudate of *Malus*, Biochcm. Physiol. Pflanzen 179, 303-309, 1984].
- 25 30
- 35 Los estudios a corto plazo son los más adecuados para determinar si los compuestos sometidos a prueba tienen cualquier efecto tóxico inmediato o si son mitógenos. Desde un punto de vista del envejecimiento de la piel es extremadamente importante descartar estas posibilidades. Esto quiere decir que para que cualquier compuesto químico sea potencialmente útil como compuesto antienvejecimiento, no debe destruir las células ni inducir la división celular en fibroblastos. Basándose en estos resultados, puede hacerse una selección para someter a prueba los efectos antienvejecimiento a largo plazo.

40 Se conoce un método de obtención de la amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico. Se basa en usar una disolución de amoniaco en metanol anhídrico para tratar éster etílico del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico a alta temperatura. Esta reacción tiene lugar en una autoclave o una tubería de vidrio graduada (a presión elevada). La solicitud de patente EP1523469 (publicada el 20-04-2005) presenta un método de obtención de derivados de amida del ácido cinámico usados como inhibidores selectivos de la amino oxidasa (MAO-B). Las descripciones de patente US2001039035 (publicada el 08-11-2001) y WO0028077 (publicada el 18-05-2000) presentan un método de aumentar la eficiencia de la conversión de derivados fenólicos en productos usando peroxidasa. Este método abarca las siguientes fases de una reacción de un conjugado que contiene un fenol marcado, detectable, con peroxidasa en presencia de un catalizador. Éste puede ser una sal inorgánica o un compuesto orgánico caracterizado por fórmulas particulares en las que X significa B(OH)<sub>2</sub>, Y es 1, o en las que X representa OH, Y es un halógeno o Q-R siendo Q un alquilo heteroatómico 1-12 lineal o ramificado, en el que los heteroátomos de unión son C, N, O o S, pudiendo abarcar el enlace que conecta la cadena de alquilo heteroatómico opcionalmente un sustituto seleccionado de entre -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub> y -SH, seleccionándose R adicionalmente de entre -OH, -COOH- y -NH<sub>2</sub> o -CH<sub>3</sub>; o una mezcla 45 de sales inorgánicas u orgánicas. La descripción cubre adicionalmente compuestos en los que R1 constituye -CH<sub>2</sub>OH o -COOH, y n es 1-8. La descripción de patente CA2009009 (publicada el 02-08-1990) presenta la aplicación farmacéutica de derivados de amida del ácido cinámico. En esta solución, los derivados de estas amidas se caracterizan por fórmulas en las que X es un halógeno eficaz como relajante muscular. La descripción de patente CN1035034 (publicada el 30-08-1989) presenta inhibidores del vuelo de insectos. En estos compuestos, 50 X<1> y X<5> son o bien hidrógeno o bien un alquilo C1-4, un halógeno o un alquilo C1-4 sustituido con halógeno; X<2>, X<3> y X<4> se seleccionan de entre hidrógeno y un alquilo C1-4, grupos hidroxi-, alcoxi- C1-4 y fenoxi-; R<1> y R<2> son o bien hidrógeno o bien un alquilo C1-4; R<3> y R<4> en los que cada uno es un hidrógeno o que juntos forman una unión de doble enlace -CR<1>R<3>- y -CR<2>R<4>-; e Y constituye un grupo hidroximetilo, -formilo, -ciano o -carbamilo N sustituido con uno o dos grupos alquilo C1-4 idénticos o diferentes, -carboxilo o éster carboxílico o sal de carboxilato. La descripción de patente HU185312 (publicada el 28-01-1985) presenta un procedimiento de eliminación de grupos de aminoácidos protectores de péptidos en una reacción con sodio metálico 55 60 65

líquido. La descripción de patente JP57046915 (publicada el 17-03-1982) presenta compuestos antialérgicos que contienen derivados de cinamida. La descripción de patente DE2540552 (publicada el 25-03-1976) presenta derivados de cicloalquil-1-ariloxi-3-amino-2-propanoles. La descripción de patente DE2412032 (publicada el 16-10-1975) presenta colorantes de diazida solubles en agua. La descripción de patente IL.47892 (publicada el 30-04-1978) presenta derivados de cinamida, su síntesis y las composiciones farmacéuticas que los contienen. Esta solución describe compuestos de cinamida caracterizados por fórmulas en las que X es un cloruro, bromuro o yoduro y R es un hidrógeno o un alquilo de 1 a 3 carbonos, siendo útil como composición farmacéutica en el tratamiento o prevención de convulsiones. La descripción de patente GB923357 (publicada el 10-04-1963) presenta derivados de cinamida y su fabricación. Esta solución se refiere a compuestos en los que R es un sustituto de alcoxilo y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son o bien hidrógeno o bien un alquilo, conteniendo el radical como mucho 6 átomos de carbono, y n es 0, 1 ó 2 o sales no tóxicas de sus ácidos. La solución también describe el método de su fabricación mediante la condensación de determinadas piridil o piridil-alquil aminas con sustituyentes de acilo de ácido cinámico apropiadamente sustituido, por ejemplo halogenado, esterificado o con un anhidrato.

5 La invención proporciona el uso de la amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico como agente antienvejecimiento y el uso de una composición que comprende la amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico como agente antienvejecimiento. La aplicación de este compuesto como preparación antienvejecimiento proporciona una composición externa para la piel que tiene un efecto antienvejecimiento excelente para prevenir la flacidez de la piel y la pérdida de brillo.

10 20 El objeto de la presente invención es el uso de la amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico como agente antienvejecimiento.

15 25 El siguiente objeto de la invención es el uso de una composición que comprende la amida del ácido a-(4-hidroxifenil)propanoico como agente antienvejecimiento. Preferiblemente, la composición comprende la amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico a una concentración de 1-500 µM.

Las figuras adjuntas facilitan una explicación mejor de la naturaleza de la presente invención.

30 30 La figura 1 presenta la síntesis de floretamida.

35 La figura 2 representa los efectos en la morfología de fibroblastos dérmicos (SNF25 p23) tras 11 días de tratamiento con floretamida (a un aumento de 20X). Las figuras 2: A, B, C, D y E se tomaron de un experimento de una curva de crecimiento en un solo paso tras 11 días de tratamiento. A dosis superiores las células parecían ser grandes en aspecto, dispuestas irregularmente y pocas en número. (Figura 2 E).

40 La figura 3 presenta la localización de JC-1 en células SNF25 p44 usando floretamida mediante microscopía de fluorescencia. La población de células mostrada en la figura 3 muestra mitocondrias polarizadas de células vivas marcadas mediante tinción fluorescente en punteado anaranjado mediante la formación y el mantenimiento de agregados J.

La figura 4 presenta el efecto de floretamida en SF25 p29 mostrando tinción de lisosomas (20X).

45 La figura 5 presenta el efecto de floretamida en la morfología de células de pase tardío tras 7 y 14 días.

50 La figura 6 presenta un análisis del nivel de expresión del gen de GAPDH en fibroblastos tratados con floretamida tras 5 semanas de tratamiento.

55 La figura 7 representa un análisis del nivel de expresión del gen de GAPDH en células HeLa tratadas con floretamida tras 48 horas de cultivo.

A continuación, hay realizaciones de ejemplo de la presente invención definida anteriormente.

#### Ejemplo 1. Síntesis de la amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propioníco

55 Se añadió N,N'-díciclohexilcarbodiimida (2,48 g, 0,012 mol) a una disolución de ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico (2 g, 0,012 mol) enfriada bruscamente (0°C) y 4-nitrofenol (1,95 g, 0,014 mol) en acetato de etilo (25 cm<sup>3</sup>) y se mezcló magnéticamente a 0°C durante 30 min. Entonces de agitó magnéticamente la mezcla de reacción durante 2 h a temperatura ambiente. Después, se filtró la N,N'-díciclohexilurea precipitada, se lavó usando acetato de etilo (5 cm<sup>3</sup>) y se evaporaron los filtrados combinados hasta la sequedad. Se añadió metanol anhídrido saturado con amoniaco (10 cm<sup>3</sup>) y se agitó magnéticamente la mezcla de reacción durante 2 h, después se evaporó la mezcla hasta la sequedad y se cargó el resto en una columna de cromatografía empaquetada con gel de sílice 60H (5-40 µm) de Merck. Se eluyó la columna con cloroformo-metanol (50:1,v/v). Se separó por cristalización el producto purificado cromatográficamente del metanol y entonces de desecó a vacío sobre pentóxido de fósforo proporcionando 1,45 g de amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico (eficiencia del 75%) (figura 1).

**Ejemplo 2. Aplicaciones antienvejecimiento**

El objetivo de estos experimentos era determinar los efectos del tratamiento a corto plazo de fibroblastos de piel humana con "compuestos de prueba" novedosos en una variedad de características biológicas de fibroblastos de piel humana, con el fin de seleccionar propiedades antienvejecimiento potenciales. Los parámetros estudiados fueron: unión celular, supervivencia, crecimiento, actividad mitocondrial, estudios de reversión, actividad proteasómica, actividad lisosómica y morfología de cultivos de pase medio de fibroblastos de piel humana adulta. Adicionalmente se realizaron algunos estudios piloto con de pase tardío próximas a la senectud para someter a prueba los "efectos de reversión de la edad".

Preparación de la disolución de prueba: se prepararon disoluciones madre de 8 mM para la amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico disolviendo aproximadamente 30 mg/ml en tampón de Hank hasta un volumen final de 30 ml. En resumen, se esterilizaron mediante filtro las disoluciones madre, se almacenaron a 4°C, y se usaron para experimentos a sus diluciones apropiadas en medios de cultivo celular según se requirió.

Cultivo celular: Se realizaron todos los experimentos en cultivos de pase tardío y medio de la línea de fibroblastos de piel adulta humana, denominada Senetek SNF25 (40-75% de vida completada). Con el fin de comprobar los efectos de los compuestos de prueba en células senecentes, se usaron células de pase tardío con aproximadamente un 75% de vida completada. Se estableció la línea celular SNF25 a partir de una biopsia de piel mamaria obtenida de una mujer joven, no fumadora y sana en el momento de una operación de reducción de pecho. Se usaron condiciones de cultivo normales de medio (DMEM) que contenían antibióticos, un 10% de suero de ternero fetal e incubación a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% con 95% de humedad. Se determinaron los efectos de los compuestos químicos de prueba en las siguientes condiciones:

Características de crecimiento: se realizaron experimentos de crecimiento a corto plazo usando placas de cultivo tisular de 24 pocillos (área de crecimiento 1,9 cm<sup>2</sup>) y placas de 96 pocillos de fondo plano (área de crecimiento 0,328 cm<sup>2</sup>). Se usaron suspensiones celulares preparadas recientemente a partir de cultivos en masa de células SNF25 mantenidas en el laboratorio. Se sembraron aproximadamente 10.000 células/pocillo en 6 conjuntos de placas de 24 pocillos. O bien se dejó que las células se unieran y se estabilizaran durante 24 horas en medio de cultivo normal o bien se añadieron directamente al medio de cultivo de una concentración final (intervalo de 40 µM a 500 µM). Se cambió el medio de cultivo con la adición de compuestos químicos semanalmente. Se contaron los números de células tras diferentes días de tratamiento en 2 pocillos de cada concentración del compuesto químico de prueba, siguiendo el método normal de tripsinización celular y recuento usando un contador Coulter. Se fijó el tercer pocillo en cada categoría con metanol frío y se tiñó con tinción de Giemsa para registro permanente y para fotografía. Se llevó a cabo el experimento hasta que los cultivos se volvieron totalmente confluentes y no fue posible crecimiento adicional.

Supervivencia celular, toxicidad y tinción con JC-1: Se midió la supervivencia celular tras la exposición a diversas dosis con ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se sembraron aproximadamente 5.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos durante 24 horas antes del experimento. Entonces se trataron las células con diversas dosis del compuesto que va a someterse a prueba. Se lavaron los pocillos en medio de Hank y se añadió medio nuevo. Tras tres días, se añadió MTT (Sigma, M2128) a 0,5 mg/ml en el medio. Tras 4 h, se retiró el MTT y se añadieron isopropanol y HCl para disolver los cristales de MTT durante 12-16 h. Se midió la absorbancia a 595 nm.

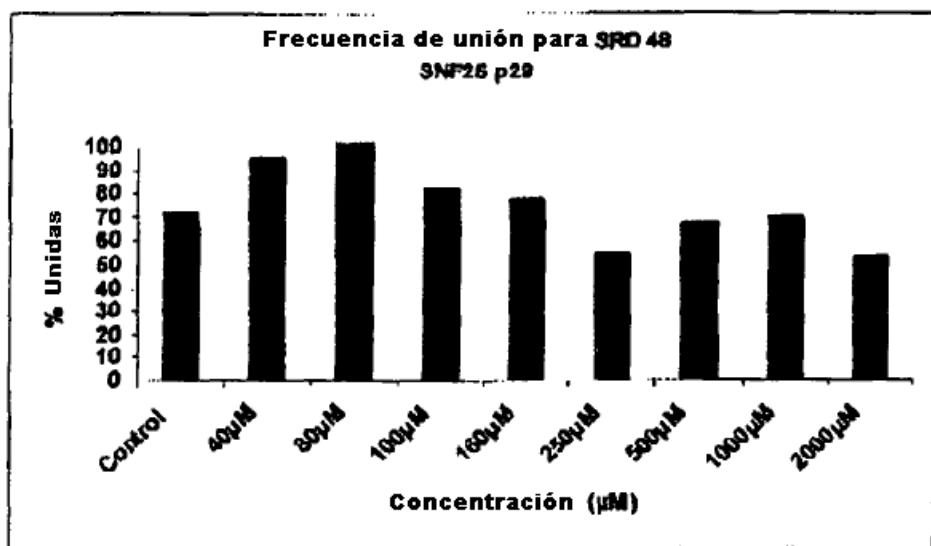
Actividad lisosómica: Se lleva rojo neutro preferentemente a los lisosomas de la célula. Se mantuvieron las células de fibroblasto en cultivo y se expusieron a compuestos de prueba a un intervalo de concentraciones. Se examinaron los cultivos visualmente tras 72 horas y se determinó el número de células viables y/o el contenido de proteína celular total, tras 72 horas de exposición, mediante el método de captación del rojo neutro. Se inocularon pocillos individuales de una placa de microtitulación de cultivo tisular de 96 pocillos con 0,2 ml de los medios apropiados que contenían células (habitualmente 3 x 10<sup>3</sup> células). Tras 1 día de incubación, se retiraron los medios y se sustituyeron con medio no modificado (control) o con medio modificado con concentraciones variadas del compuesto que va a someterse a prueba. Tras 3 días de exposición al compuesto, se retiraron los medios y se sustituyeron con medios que contenían el 0,001% de NR. Entonces se devolvió la placa de ensayo al incubador durante otras 3 h para permitir la captación del colorante supravital en los lisosomas de las células viables. Despues, se retiraron los medios y se lavaron rápidamente las células con formaldehído al 0,5% - CaCl<sub>2</sub> al 1% seguido por 0,2 ml de una disolución de ácido acético al 1% -etanol al 50% para extraer el colorante de las células. Tras 10 min. a temperatura ambiente y una agitación breve pero rápida en un agitador de placas de microtitulación, se transfirieron las placas a un espectrofotómetro de microplacas equipado con un filtro de 540 nm para medir la absorbancia del colorante extraído. Se compararon las toxicidades de los diversos compuestos con las de los cultivos control calculando los datos obtenidos.

Actividad proteasómica: Se determinó la actividad similar a quimiotripsina en extractos celulares preparados a partir de células tratadas y no tratadas mediante degradación *in vitro* de oligopéptidos por el proteasoma.

Marcado por 5-bromo-2'-desoxiuridina y detección usando lector de placas Elisa: Se realizan estudios de toxicidad usando el ensayo de BrdU, que se basa en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina durante la síntesis de ADN y un marcador para la proliferación celular. Se determinó la proporción de células que experimentan duplicación de ADN y por tanto entran en la siguiente fase de la división celular, marcando las células con bromodesoxiuridina, usando un kit disponible comercialmente (Roche Diagnostics GmbH). En resumen, se cultivaron las células en una placa de 96 pocillos de microtitulación. Se añadió BrdU al medio de cultivo y se incorporó en ADN sintetizado recientemente (concentración resultante 110 µM). Entonces se incubó la placa durante aproximadamente 2-18 horas y se fijó con 200 µl de fijador de etanol (etanol 0,5 µM/HCl) tras lavar con PBS. 100 µl de solución de trabajo de nucleasa (dilución 1:100 con tampón de incubación) por pocillo durante 30 min. a 37°C en ausencia de CO<sub>2</sub> el tratamiento nuclear mejora la accesibilidad de BrdU por la detección de anticuerpos. Se añaden 100 µl de fragmentos Fab anti-BrdU-POD con 9,9 µl de PBS y BSA (conc. final 200 µg/ml), ahora se retira el conjugado de anticuerpos y se lava con PBS. La etapa final implica la adición de 100 µl de peroxidasa por pocillo incubado a temperatura ambiente hasta que las muestras positivas mostraron un color verde, que era claramente distingible del color del sustrato de peroxidasa puro. Se midió la absorbancia a 405 nm con referencia a 490 nm y se correlacionó directamente con el nivel de BrdU incorporado en la célula.

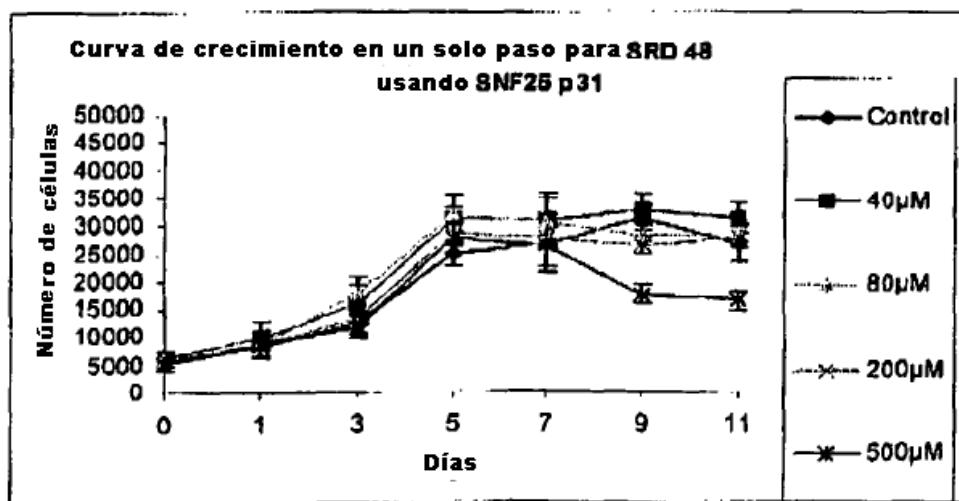
### Resultados y comentarios

Unión celular- El porcentaje de células unidas a la superficie del matraz de cultivo no se vio afectado en ningún grado significativo tras seis horas de tratamiento con floretamida de 40 µM a 2 mM.



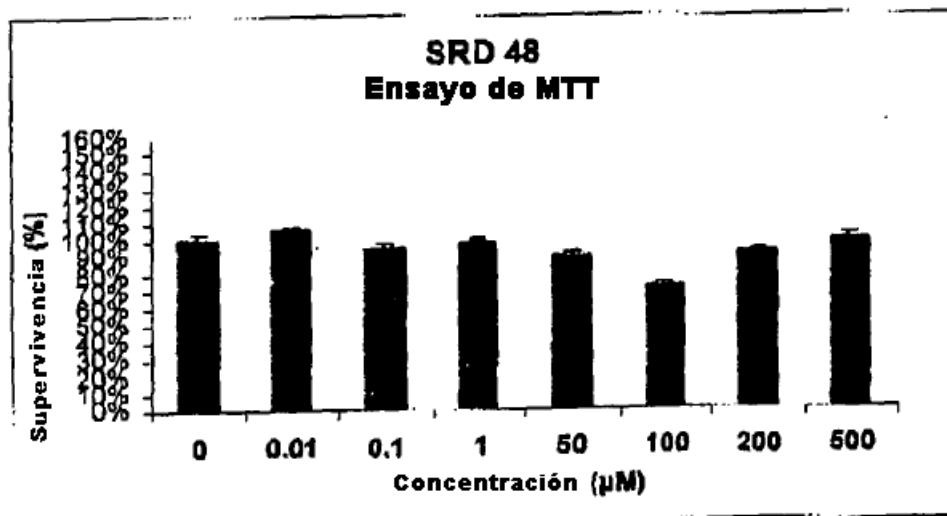
Se observó unión mejorada a 40 µM y 80 µM (20-30%). Este compuesto no es inmediatamente tóxico para el fibroblasto dérmico humano. Por tanto, para todos los experimentos adicionales, podría añadirse floretamida al medio de cultivo en el momento de sembrar las células.

Crecimiento a corto plazo – Se muestran los efectos del tratamiento con floretamida sobre el crecimiento a corto plazo en el gráfico y en la figura 2.



El crecimiento celular mostró un pico en el día 5 para casi todas las dosis. Tras 11 días de tratamiento, se observó un aumento del 10-20% en los números de células en células tratadas con floretamida de 40  $\mu\text{M}$  a 200  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, el crecimiento celular se inhibió significativamente en más del 50% a concentraciones superiores (500  $\mu\text{M}$ ). Esto muestra que el intervalo de dosis entre 40  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$  de floretamida parece adecuado para el tratamiento a largo plazo de fibroblastos de piel humana.

- 5 Efectos sobre la morfología de fibroblastos dérmicos (SNF25 p23) tras 11 días de tratamiento con amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico (a un aumento 20X) – Las fotografías mostradas en la figura 2: A, B, C, D y E se tomaron de un experimento de curva de crecimiento en un solo paso tras 11 días de tratamiento. Se observó citotoxicidad de las células a dosis mayores de 200  $\mu\text{M}$ . A dosis superiores las células parecían ser más grandes, dispuestas irregularmente y escasas (figura 2 E).
- 10 15 Actividad mitocondrial- A continuación se presenta un amplio intervalo de dosis (que oscilan entre 0,01  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$ ) en fibroblastos dérmicos de edad media sometidos a prueba para determinar los efectos mitocondriales de floretamida.

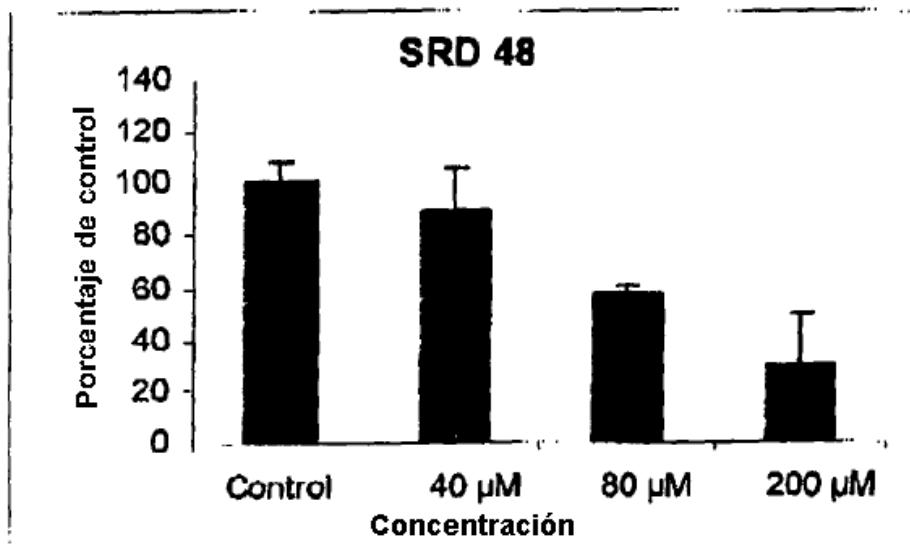


- 20 El tratamiento con amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico no tienen efectos negativos sobre la actividad de las mitocondrias en fibroblastos dérmicos hasta una dosis de 500  $\mu\text{M}$ . Se muestra que no hay inducción del crecimiento celular dentro del intervalo de dosis sometido a prueba.
- 25 Se muestra la localización de JC-1 en células SNF25 p44 usando floretamida mediante microscopía de fluorescencia en la figura 3.
- 30 Se realizó la tinción para JC-1 tras pretratamiento con floretamida sobre fibroblastos dérmicos durante un periodo de 3 días para ver el potencial mitocondrial. La población de células mostrada en la figura 4 muestra mitocondrias polarizadas de células vivas marcadas por tinción fluorescente en punteado rojo anaranjado mediante la formación y

el mantenimiento de agregados J. Se observó tinción fluorescente en punteado rojo anaranjado en el tratamiento con amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico de células a todas las dosis.

Efecto de la amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico sobre la tasa de actividad lisosómica – El ensayo de NRU (captación de rojo neutro) facilita la evaluación rápida de la citotoxicidad de diferentes compuestos de examen. Las imágenes en la figura 4 sugieren que el patrón de tinción de las células mostró autofagia (40  $\mu$ M y 80  $\mu$ M), y los datos del gráfico a continuación muestran que hasta 200  $\mu$ M, la tasa lisosómica de las células tratadas con la amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico disminuyó de manera dependiente de la dosis en comparación con las no tratadas.

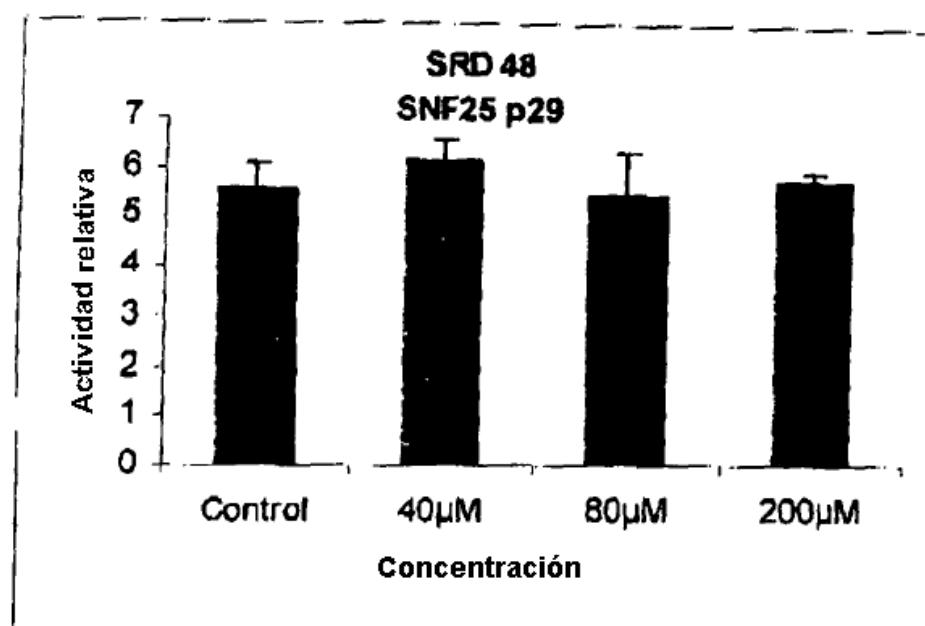
10



15

A un intervalo de dosis de 40  $\mu$ M y 80  $\mu$ M, los resultados mostraron una disminución del 15-40% en la autofagia lisosómica. En conclusión, se observó una disminución en la actividad lisosómica en células tratadas con concentraciones mayores de floretamida 40  $\mu$ M.

Efecto de la amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico sobre la actividad similar a quimiotripsina- El tratamiento con floretamida (de 40  $\mu$ M a 200  $\mu$ M) no mostró efecto sobre la actividad proteasómica de células humanas.



20

Efectos sobre células de fase tardío – Organización del citoesqueleto: Se trataron células de fase tardío con más de un 75% de vida con diferentes dosis de floretamida con el fin de ver si este tratamiento podía revertir cualquiera

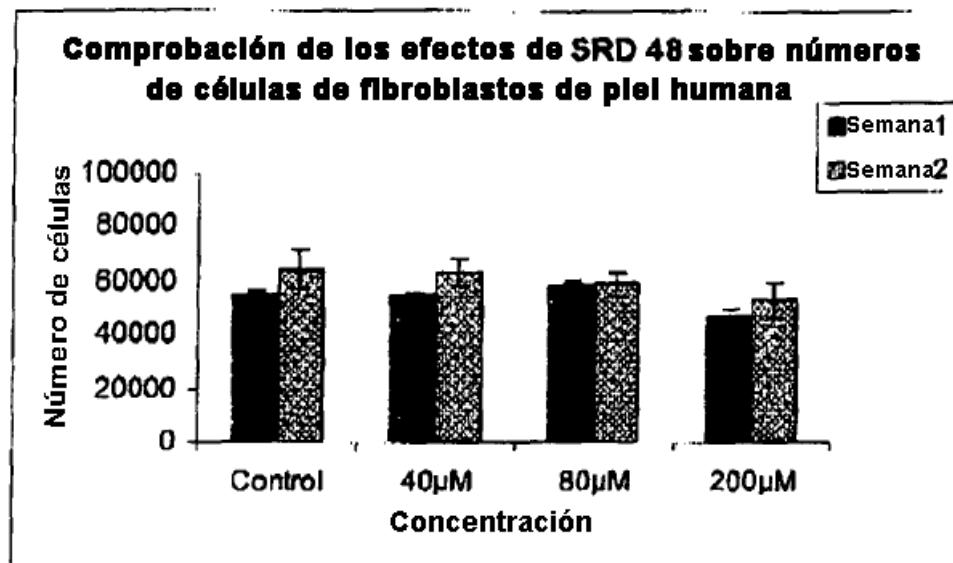
de los cambios relacionados con la edad. El patrón de tinción de actina en células de edad media tras 3 días no mostró diferencias obvias entre células tratadas y no tratadas.

Efecto de la amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico sobre la morfología de células de pase tardío tras 7 y 14 días  
 5 – Morfología de células senescentes: Se trataron fibroblastos de piel humana de pase tardío (aproximadamente un 75% de vida completada) con diversas dosis de floretamida para ver si este tratamiento podía revertir alteraciones relacionadas con la edad en su morfología. La figura 5 muestra que hubo diferencias sutiles en el aspecto de las células tras siete y catorce días de tratamiento. No se observó comportamiento heterogéneo en las células. No pudo encontrarse una mejora en las células tras 14 días de tratamiento.

10 Supervivencia celular: Se sembraron números iguales de células senescentes en matraces separados y se trataron con diferentes concentraciones de floretamida. Se determinaron los números de células usando un contador Coulter tras tripsinización y resuspensión de células tras 7 y 14 días de tratamiento.

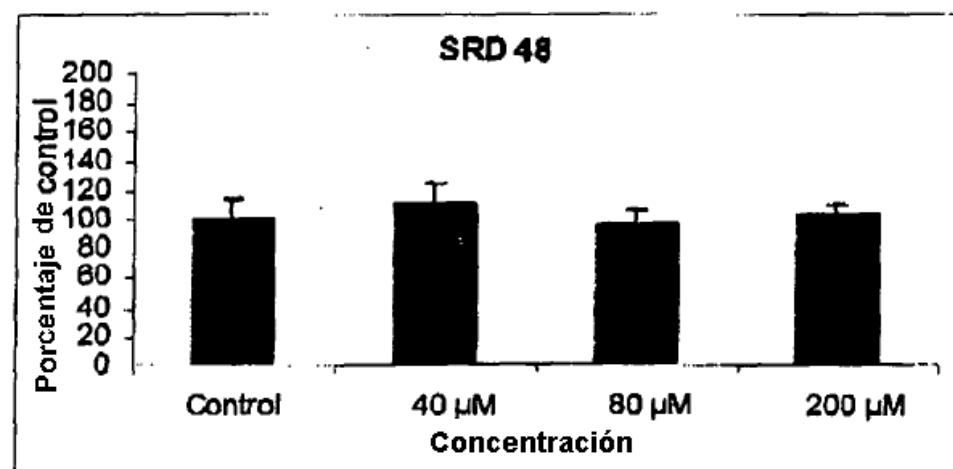
15 Número de células tras 7 días y 14 días de tratamiento con la amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico – El grafico a continuación muestra que los números de células de pase tardío supervivientes tras tratamiento con la amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico fueron casi similares sin mucha diferencia tras una y dos semanas. Sin embargo, a dosis superiores se observó una reducción dependiente de la dosis en el crecimiento celular tras 7 y 14 de tratamiento.

20



Inducción de proliferación celular (síntesis de ADN) – Con el fin de determinar si la floretamida indujo proliferación celular adicional, se examina el grado de síntesis de ADN.

25



Los resultados mostraron que no había diferencias significativas en la síntesis de ADN en fibroblastos pretratados con amida del ácido 3-p-hidroxifenil-propiónico en comparación con los controles.

Se realizó RT-PCR sobre ARN aislado de células de la línea 1 (no tratadas con floretamida) y células de la línea 2 (tratadas con floretamida 100 uM). Se determinaron diferencias en la expresión del gen de GAPDH usando un sistema de detección y cuantificación de la radiactividad y el software ImageQuant. Datos presentados en la figura 6.

- 5 Se realizó una RT-PCR sobre ARN aislado de células de la línea 1 (no tratadas con floretamida) y células de la línea 2 (tratadas con floretamida 100 uM). Se determinaron diferencias en la expresión del gen de GAPDH usando un sistema de detección y cuantificación de la radiactividad y el software ImageQuant. Datos presentados en la figura 7.
- 10 Conclusión – Los resultados obtenidos a partir de esta serie de experimentos sobre los efectos a corto plazo de la floretamida sobre fibroblastos de piel humana indican que este compuesto tiene efectos antienvejecimiento beneficiosos significativos y pueden llevarse a cabo estudios a largo plazo sobre fibroblastos dérmicos. A 40 y 80  $\mu$ M, puede observarse unión celular potenciada (10 - 20%) junto con una estimulación del crecimiento celular a 40  $\mu$ M y 80  $\mu$ M mediante un análisis de curva del crecimiento en un solo paso (hasta 11 días).

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de la amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico como agente antienvejecimiento.
- 5 2. Uso de una composición que comprende la amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico como agente antienvejecimiento.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicha composición comprende la amida del ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico a una concentración de 1-500 µM.

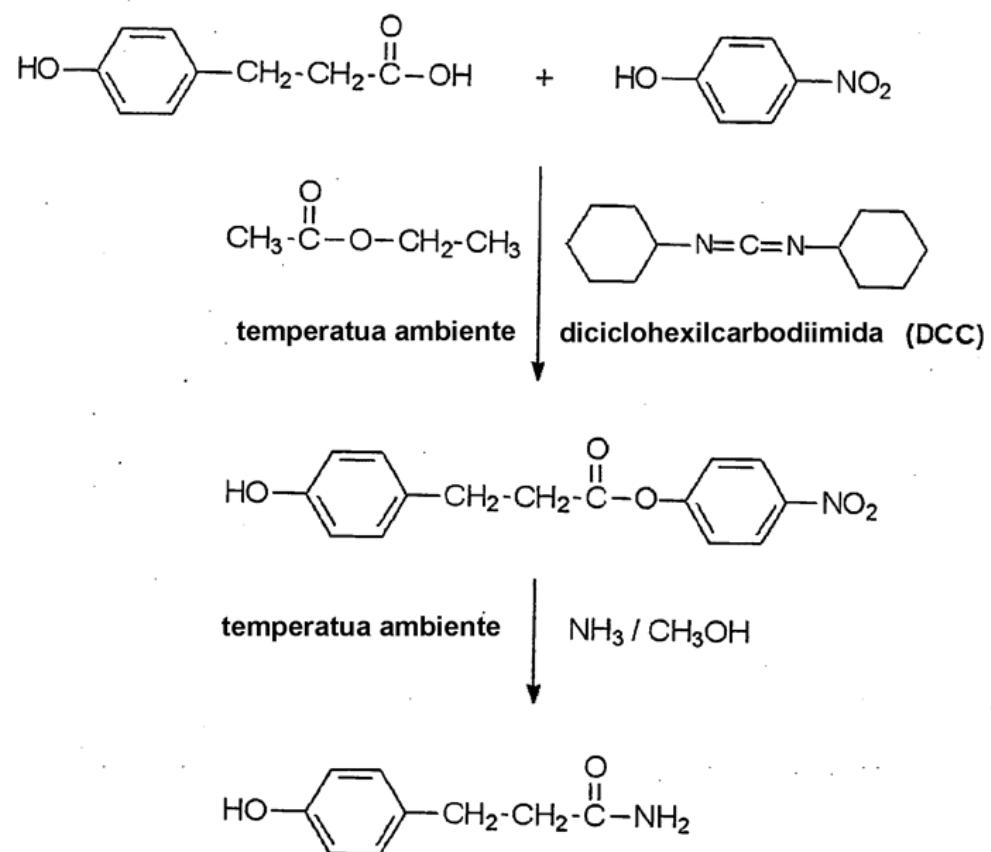


Fig. 1

Control

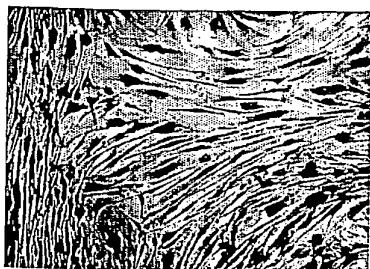


Fig. 2A

+40  $\mu$ M



Fig. 2B

+80  $\mu$ M

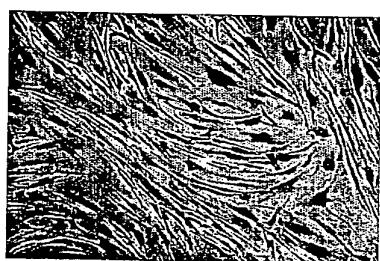


Fig. 2C

+200  $\mu$ M



Fig. 2D

+500  $\mu$ M

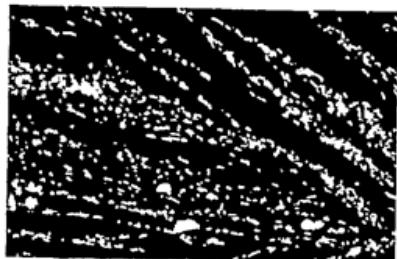


Fig. 2E

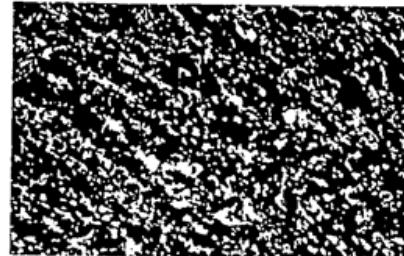
Fig. 2

Tinción con JC-1

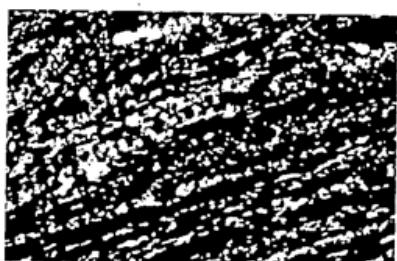
Control



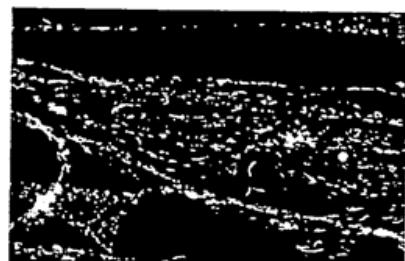
40  $\mu$ M



80  $\mu$ M



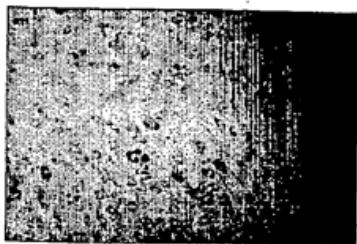
200  $\mu$ M



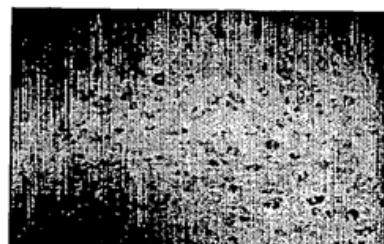
**Fig. 3**

Actividad lisosómica

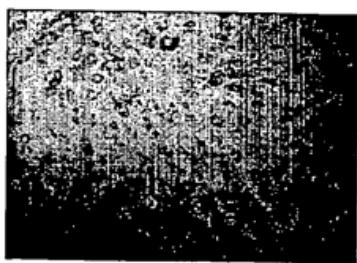
Control



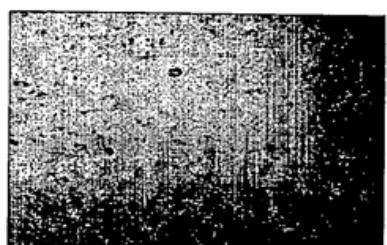
40  $\mu$ M



80  $\mu$ M



200  $\mu$ M



**Fig. 4**

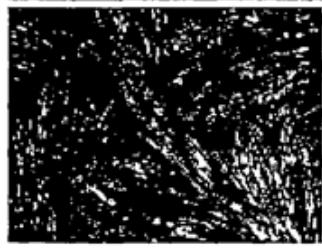
Supervivencia de las células de pase tardío (SF25-p45)

(Semana-1)

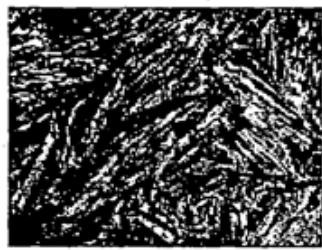
(Semana-2)



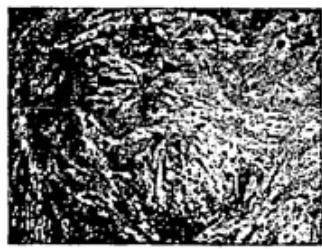
Control



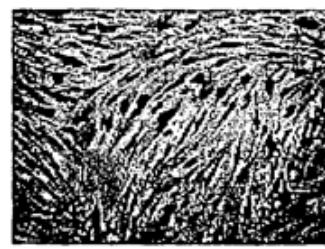
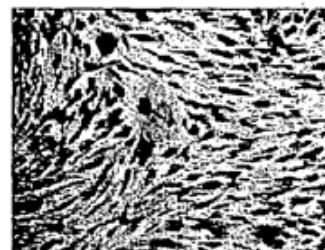
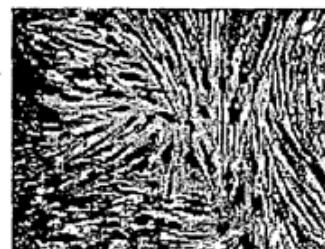
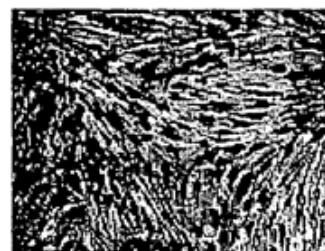
40  $\mu M$



80  $\mu M$



200  $\mu M$



**Fig. 5**

Citotoxicidad en células del fibroblasto (5semanas)

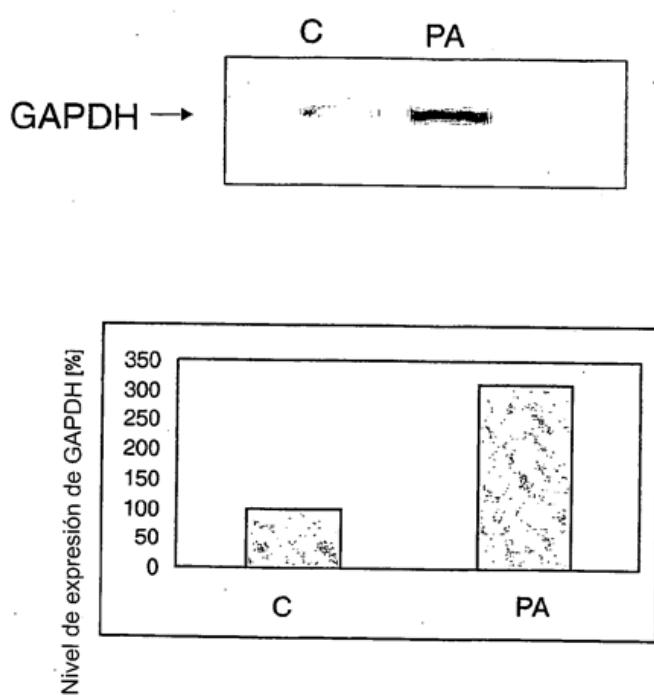
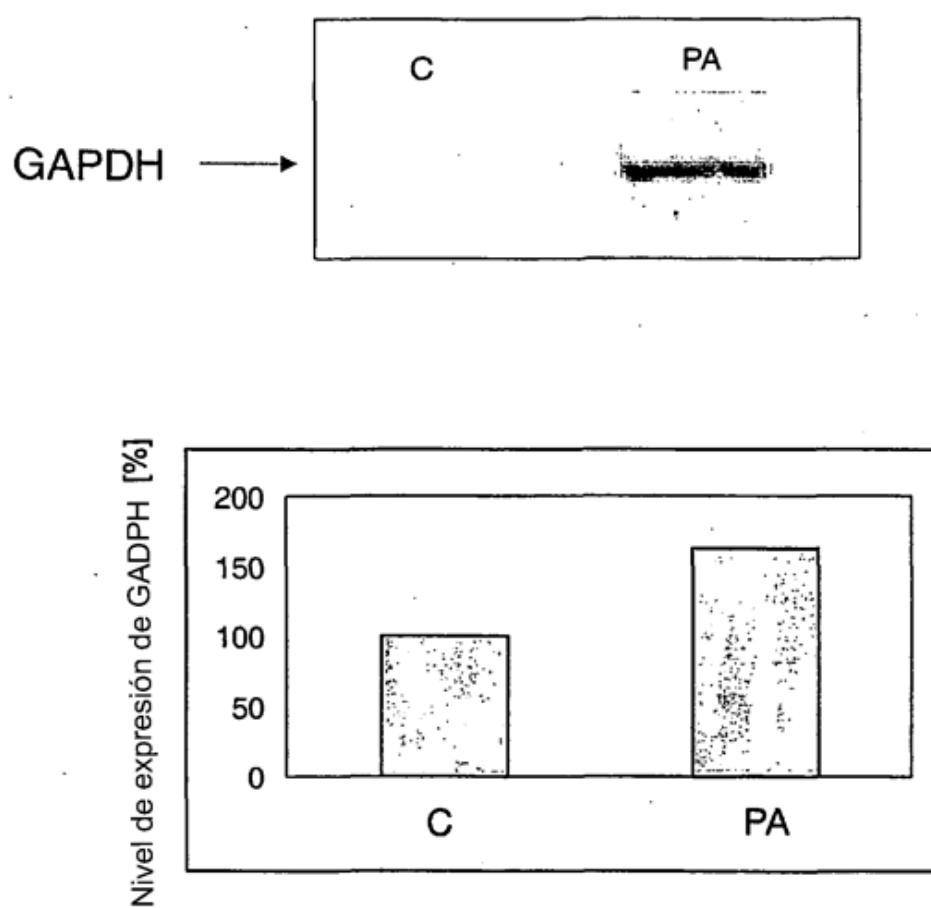


Fig. 6

## Citotoxicidad en células HeLa (48h)



**Fig. 7**