



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

(21) **PI0620811-8 A2**

(22) Data de Depósito: 28/12/2006
(43) Data da Publicação: 22/11/2011
(RPI 2133)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/07
A61K 31/34
A61K 31/355
C07C 229/00
A61K 31/20

(54) **Título:** HETERÔMEROS DE ARGININA PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA

(30) **Prioridade Unionista:** 30/12/2005 US 60/755,203

(73) **Titular(es):** Revance Therapeutics, Inc.

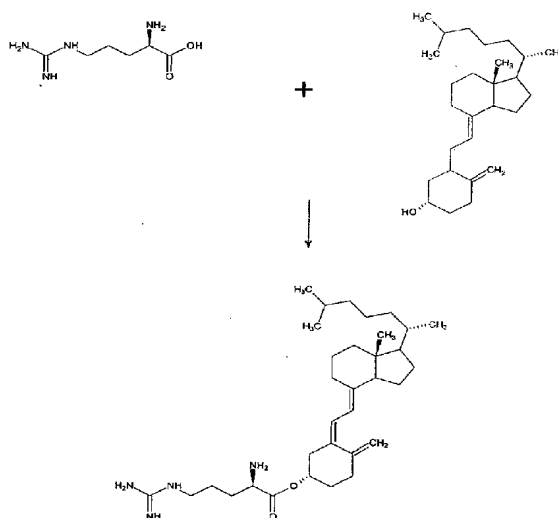
(72) **Inventor(es):** Jacob M. Waugh

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

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006062680 de 28/12/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/079394de 12/07/2007

(57) **Resumo:** HETEROMEROS DE ARGININA PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA. A presente invenção refere-se a uma estratégia para prover benefício terapêutico ou cosmético para a pele aplicando topicamente argininaquimicamente ligada a um segundo composto (não oligo-arginina) a fim de aumentar a distribuição transepitelial de arginina sobre a pele, através de uma combinação de solubilidade e fluxo aumentados. Os heterômeros de arginina da invenção podem adicionar propriedades complementares ou benéficas para a pele além daquelas que são relacionadas à arginina.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**HETERÔMEROS DE ARGININA PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório U.S. Nº 60/755.203 depositado no dia 30 de dezembro de 2005, e incorporado por referência em sua inteireza neste pedido provisório inteiro.

A invenção refere-se aos heterômeros de arginina que têm uma capacidade melhorada de penetrar na pele de mamíferos e provê efeitos benéficos para a saúde e aparência da pele.

10 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A L-Arginina é um aminoácido de ocorrência natural que desempenha muitos papéis essenciais no corpo humano. Um desses papéis é como um substrato para a de óxido nítrico (NOS). Sob condições normais no corpo humano, o óxido nítrico (NO) tem uma média de vida de somente 3-5 segundos devido a sua inativação rápida pela oxihemoglobina ao formar a metemoglobina. A GMP cíclica é um produto de NO a jusante e controla a maioria dos efeitos biológicos do NO, embora a família da sintase de óxido nítrico (NOS) de enzimas controle a produção de NO. Os três tipos principais de NOS são: 1) induzível (iNOS); 2) neuronal (nNOS); e 3) endotelial (eNOS), todos os quais são encontrados na pele. Todas as três dessas isoformas necessitam de oxigênio e fosfato de dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NADPH) como substratos. Dimetil L-arginina assimétrica (ADMA) é um inibidor basal da família de NOS, e níveis elevados desta substância foram encontrados em casos de hipertensão, hipercolesterolemia e outras doenças associadas com vasodilatação comprometida. A elevação da concentração de L-arginina tem sido apresentada para superar o efeito inibidor de ADMA sem levar a um aumento da produção de NO.

30 O NO é conhecido por desempenhar um papel importante na fisiologia da pele com efeitos sobre a microvasculatura e o fluxo de sangue, manutenção da função de barreira, condições inflamatórias da pele tais como psoríase, resposta à luz ultravioleta e cura de ferimento. O aumento da concentração de NO no tecido estimula a vasodilatação local e angiogênese.

Entretanto, o NO se espalha livremente de tal maneira que é difícil manter concentrações eficazes na pele. Um estratégia alternativa seria elevar a concentração de arginina para aumentar a quantidade de substrato para o NOS usar na produção de NO. Entretanto, a arginina por ela mesma tem muito pouca penetração na pele. Uma solução para este problema em outros tecidos tem sido ligar a L-arginina nos oligômeros de 7 a 15 unidades de comprimento (oligoarginina). Esses compostos podem eficazmente penetrar na pele e aumentar as concentrações de NO e têm mostrado transportar agentes de ligação covalentemente pelas membranas citoplásmicas (Cosmetic Formulations contendo Oligômeros de L-Arginina, WO 03/072039 A2). Entretanto, não ficou claro se esses benefícios foram devido às propriedades de transporte relativamente únicas da oligoarginina.

Um exemplo específico da importância da angiogênese na pele está na manutenção de folículos capilares saudáveis. Durante o ciclo de vida do folículo, a angiogênese é largamente controlada por um equilíbrio entre fatores pro- e antiangiogênicos. Tem sido mostrado que a fase anágena é especialmente dependente de fatores pró-angiogênicos para estimular o aumento do fluxo de sangue necessário para as necessidades nutricionais aumentadas do folículo (Formulações Cosméticas contendo Oligômeros de L-Arginina, WO 03/072039 A2).

A invenção descrita aqui a seguir é dirigida para uma estratégia para prover benefícios terapêuticos ou cosméticos para a pele pela aplicação tópica de arginina quimicamente ligada a um segundo (não-oligoarginina) composto a fim de aumentar a distribuição transepitelial de arginina através de uma combinação de solubilidade aumentada e fluxo em toda a pele. Os heterômeros de arginina da invenção podem também prover outras propriedades complementares ou benéficas para a pele além daquelas que são relacionadas à arginina.

Sumário da Invenção

Esta invenção provê uma estratégia para prover benefícios terapêuticos ou cosméticos para a pele aplicando topicamente um heterômero de arginina. Um heterômero de arginina é uma molécula de arginina única

quimicamente ligada a um segundo (não- oligoarginina) composto a fim de aumentar a distribuição transepitelial do heterômero de arginina através de um ou mais fluxos e solubilidade aumentada por toda a pele. A estrutura geral do heterômero de arginina é dada na fórmula I:

5

A – R

I

em que A é uma molécula de arginina única que tem um grupo guanidina livre e R é um segundo composto que é uma molécula orgânica que não é arginina nem oligo-arginina. A molécula de arginina pode ser ligada ao segundo composto através de seu grupo carbóxi ou amino e o grupo guanidino da arginina permanece livre. O heterômero de arginina pode ter maior fluxo pela pele do que a arginina monomérica sozinha.

O segundo composto dos heterômeros de arginina da invenção pode adicionar outras propriedades complementares ou benéficas para a pele além daquelas relacionadas à arginina. Mais especificamente, o segundo composto do heterômero pode prover outros benefícios tais como, capacidade antioxidante, aumento de angiogênese, redução nos sintomas da acne, redução de secreções glandulares, redução dos efeitos do envelhecimento, ou redução de rugas. Um exemplo de uma modalidade específica da invenção é arginina ligada à vitamina E por uma ligação de éster. Além disso, em relação às estratégias de oligômeros, esses heterômeros de arginina oferecem segurança significativa e custo benéficos.

Outra modalidade da invenção provê um método para fornecer um efeito benéfico para a pele que compreende aplicar topicamente uma composição compreendendo um heterômero de arginina de Fórmula I. O efeito benéfico pode incluir, mas não está limitado a, reduzir ou prevenir lesões causadas pela luz solar, provendo atividade antioxidante, reduzindo o aparecimento de linhas finas e rugas na pele, reduzir secreções glandulares, reduzir os efeitos do envelhecimento, tratar a acne e induzir angiogênese no folículos capilares.

30 Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1 - diagrama mostrando a formação de heterômero de arginina a de vitamina C em que R é hidrogênio ou arginina protegida Boc.

Figura 2 - diagrama mostrando a formação de heterômero de arginina de vitamina C em que G é hidrogênio ou arginina desprotegida.

Figura 3 - um gráfico de IR mostrando o composto Arginina- Vitamina C.

5 Figura 4 - diagrama mostrando a formação de heterômero de arginina de vitamina D3.

Figura 5 - um TLC mostrando o produto Arg-Vit D3.

Figura 6 - efeito de L-Heterômeros de arginina aplicados topicamente em perfusão de fronte de ser humano.

10 Descrição Detalhada da Invenção

Esta invenção descreve um número de heterômeros de arginina que servem como substratos para sintase de óxido nítrico (com ou sem processamento do heterômero) e que tem fluxo aumentado com respeito à arginina nativa, do heterômero por toda a pele quando aplicado topicamente. Em
15 outras modalidades por exemplo, os heterômeros também provêem propriedades adicionais tais como atividade antioxidante.

Os heterômeros desta invenção têm uma estrutura como na Fórmula I:



20 em que A é uma molécula de arginina única covalentemente ligada a um segundo composto R. A molécula de arginina pode ser ligada através de seu grupo carbóxi ou amino livre e o grupo arginina guanidino permanece não reagido e livre. O segundo composto, R, é uma molécula orgânica que não é arginina ou oligo-arginina. Em uma modalidade desta invenção o segundo
25 composto R ainda provê uma ou mais das propriedades selecionadas do grupo que consiste em melhorar a solubilidade em óleo ou água do heterômero de arginina em comparação à arginina sozinha, e melhorar a taxa de fluxo do heterômero de arginina através da pele comparada à arginina sozinha. O segundo composto pode ainda prover benefícios adicionais para a
30 pele. O segundo composto é compatível para contato com tecidos de mamífero por ser não-tóxico, não-alérgico e não-irritante. Exemplos de segundo compostos apropriados incluem, mas não estão limitados a, vitaminas, reti-

noides e ácidos graxos.

Ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E) e retinoides (vitamina A) quando usados de acordo com esta invenção podem prover propriedades benéficas para a pele. O ácido ascórbico estimula a síntese do tecido conjuntivo e em particular ele estimula e regula a produção de colágeno. Ele atua para ajudar a prevenir ou minimizar a oxidação de lipídio e outras formas de lesões celulares resultantes de exposição prolongada aos raios ultravioleta. Acredita-se que o ácido ascórbico ajuda a inibir a formação de melanina e libera a histamina das membranas celulares. O ácido ascórbico compensa a deficiência de vitamina E na pele, ajuda a prevenir a descoloração da pele, e tem atividade de radical antilivre. Alfa-tocoferol é um antioxidante para proteger os fosfolipídios da membrana da célula e os efeitos prejudiciais dos radicais livres (J.B Chazan et al. Free Radicals and Vitamina E. Cah. Nutr. Diet. 1987 22(I):66-76). Os retinóides bloqueiam mediadores de inflamação na pele e aumentam a produção de procolágeno levando a quantidades mais alta de colágeno do tipo I e tipo III.

Em algumas modalidades, o segundo composto é uma vitamina tal como vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B7, vitamina B9, vitamina B 12, vitamina C, vitamina D1, vitamina D2, vitamina D3, vitamina D4, vitamina D5, vitamina E, e vitamina K.

Em outras modalidades o segundo composto é um retinóide. Retinóides incluem retinol, análogos naturais e sintéticos de vitamina A (retinol), vitamina A aldeído (retinal), ácido de vitamina A (ácido retinóico), incluindo todos os ácidos trans, 9-cis, e 13-cis, etretinato, e outros como descrito em EP-A2-0 379367, na Patente U.S. Nº 4.887.805, e Patente U.S. Nº 4.888.342 (cujas descrições estão todas incorporadas aqui a seguir por referência). Espera-se que vários retinóides e compostos sintéticos tendo atividade de retinóide sejam úteis nesta invenção, até o ponto em que eles exibem atividade de retinóide *in vivo*, tal como nas seguintes Patentes norte-americanas de Nºs 5.514.825; 5.698.700; 5.696.162; 5.688.957; 5.677.451; 5.677.323; 5.677.320; 5.675.033; 5.675.624; 5.672.710; 5.688.175;

5.663.367; 5.663.357; 5.663.347; 5.648.514; 5.648.503; 5.618.943; 5.618.931; 5.618.836; 5.605.915; 5.602.130. Ainda outros compostos descritos como tendo atividade retinóide estão descritos em outras Patentes norte-americanas de N^{os} 5.648.563; 5.648.385; 5.618.839; 5.559.248; 5.616.712; 5.616.597; 5.602.135; 5.599.819; 5.556.996; 5.534.516; 5.516.904; 5.498.755; 5.470.999; 5.468.879; 5.455.265; 5.451.605; 5.343.173; 5.426.118; 5.414.007; 5.407.937; 5.399.586; 5.399.561; 5.391.753; e os similares, as descrições de todos as patentes anteriores e a seguir e referências da literatura são aqui a seguir incorporadas por referência.

10 Em modalidades adicionais da invenção, o segundo composto é um ácido graxo. Ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos que têm uma cauda alifática saturada ou insaturada. Como definido no International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7th Ed. (1997) volume 2, página 1567 (a descrição dos quais está incorporado aqui a seguir por referência)

15 os ácidos graxos têm cerca de 7 ou mais átomos de carbono. Por exemplo, o ácido palmítico é um ácido graxo encontrado no óleo de palma e outras gorduras. Ele é o mais abundante ácido graxo natural. O ácido palmítico é também um dos principais ácidos graxos da pele produzidos pelas glândulas sebáceas. O ácido palmítico é usado nos cuidados da pele e preparações de

20 cosméticos como um agente umectante. Ele normaliza a pele para um estado normal, saudável e estabiliza o equilíbrio oleoso. Ele suava a pele e atua como um agente antiqueratinizante. É também usado como um emulsificante, surfactante e um texturizador de fórmula. Ésteres de ácido palmítico são usados para conferir uma qualidade sedosa para a pele e o cabelo. O

25 ácido de óleo palmítico serve como um veículo para permitir a penetração do pentapeptídeo na pele. Ele é largamente usado como um lubrificante.

Em adição ao ácido palmítico, ácidos graxos apropriados incluem, mas não são limitados a, ácidos undecilênicos, palmitoleicos, oléicos, linoléicos, linolênicos, araquidônicos e erucicos. Ácidos graxos apropriados

30 adicionais podem ser encontrados no International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7th Ed. (1997) volume 2, página 1567.

A molécula de arginina e o segundo composto são ligados por

uma ligação covalente. Os tipos de ligações incluem, mas não são limitados a, ligações de éster, amida, éter e carbamida. Modalidades da invenção incluem, mas não são limitadas a, heterômeros de arginina com vitaminas, retinóides ou ácidos graxos.

5 O heterômero de arginina é distribuído através da pele em uma quantidade eficaz para produzir um efeito benéfico sobre a pele. Como usado aqui a seguir, o termo "efeito benéfico" inclui qualquer melhoramento na aparência ou sensação da pele ou qualquer efeito protetor contra lesão da pele resultante de fontes externas tais como a luz solar ou de fontes internas
10 tais como os efeitos do envelhecimento. O termo "quantidade eficaz" refere-se àquela quantidade do heterômero de arginina que penetra na camada do estrato córneo da pele que é suficiente para produzir o efeito benéfico desejado.

 Uma vez na pele, os heterômeros desta invenção podem degradar para liberar arginina e o segundo composto. Não é necessário o heterômero degradar enquanto o grupo guanidino da porção de arginina do heterômero permanecer não reagido e livre de tal modo que ele pode servir como um substrato para a sintase de óxido nítrico. Os heterômeros de arginina podem ser estabilizados em formulações antes da aplicação. Dessa maneira,
15 as taxas mais altas de distribuição transepitelial de arginina podem ser conseguidas de uma maneira relevante para prover o efeito benéfico pretendido.
20

 Os heterômeros de arginina da invenção podem ser usados em diversos cosméticos ou composições dermatológicas previstas para aplicação tópica. Devido os heterômeros de arginina poderem estimular a angiogênese no folículos capilares, essas composições podem ser usadas para a prevenção da perda de cabelo ou para aumentar o crescimento dos cabelos. Quando usados para afetar o crescimento dos cabelos essas composições são aplicadas no couro cabeludo, nas sobrancelhas ou nas pestanas. As
25 composições podem ser aplicadas nos lábios para melhorar a cor e o aspecto roliço. Quando aplicadas na pele, as composições de heterômero de arginina podem ser usadas para reduzir a aparência de linhas finas e rugas, me-
30

lhorar a elasticidade da pele, reduzir inchação, suavizar a textura da pele, prover sensação sedosa para a pele, prover um efeito umectante, prover lubrificação, prover uma cor rosada natural, reduzir os efeitos do envelhecimento ou prover outros benefícios cosméticos.

- 5 Para aplicação na pele ou lábios, os heterômeros de arginina são incluídos em composições que compreendem carreadores ou veículos cosmeticamente ou dermatologicamente aceitáveis que são apropriados para a área do corpo para a qual eles serão aplicados. O termo "cosmeticamente ou dermatologicamente aceitáveis," como usado aqui a seguir, inclui
- 10 as composições ou os compostos apropriados para uso em contato com tecidos fisiológicos sem toxicidade, incompatibilidade, instabilidade e os similares indevidos.

- Diversas composições e formulações tipicamente usadas em produtos aplicados na pele, lábios e cabelo podem ser usadas com os heterômeros de arginina da invenção. Esses incluem, mas não são limitados a
- 15 preparações para o tratamento da pele tais como preparações para lavagem e limpeza de pele, sabonetes menos os detergentes, loções para o corpo, emulsões ou óleos para a pele, preparações para depilação ou esfoliação da pele ou mascaras de "peeling"; preparações para banhos tais como preparações para banho sólidas ou líquidas, cubos e sais para banho; preparações
- 20 para tratamento pessoal cosmético tais como maquiagem facial na forma de cremes para o dia ou cremes em pó, pó para o rosto, ruge ou maquiagem em creme; preparações para os olhos tais como sombra, máscara, delienador ou cremes para os olhos; preparações para cuidados com os lábios tais como batões, brilho para os lábios ou lápis de contorno dos lábios; preparações para cuidados com as unhas tais como polimento ou esmalte para as unhas; preparações para tratamento dos pés tais como banhos para os pés, pós para o pé, cremes para os pés ou bálsamos para os pés, desodorantes e antiperspirantes especiais ou preparações para remover calosidades; preparações para filtro solar tais como loções, cremes, óleos, bloqueadores de
- 30 sol, preparações pré-bronzeamento, preparações para depois do sol, preparações para bronzeamento da pele cremes auto-bronzeadores; preparações

para tratamento dos cabelos e cuidados com os cabelos tais como chamús, condicionadores, cremes estilizantes, géis estilizantes, espumas, rinsagens, laquês, tintas e corantes para os cabelos.

5 As composições da invenção podem ser na forma de soluções, emulsões, microemulsões, suspensões, cremes loções, géis, produtos de ceratais como por exemplo batons e pós e outros cosméticos sólidos ou vários tipos incluindo mas não limitados a antiperspirantes e delineador para os olhos.

10 As composições de heterômero de arginina da invenção podem também compreender outros ingredientes comumente usados nos produtos para tratamento de pele e cabelo tais como antimicrobianos, umectantes, agentes de hidratação, agentes de penetração, conservantes, emulsificantes, óleos naturais ou sintéticos, solventes, tensoativos, detergentes, agentes gelatinosos, emolientes, antioxidantes, fragrâncias, agentes de enchi-
15 mento, ceras espessantes, absorventes de odor, matéria corante, agentes corantes, pós, agenes de controle de viscosidade, anestéticos, agentes anti-coceira, extratos botânicos, agentes condicionadores, agentes para escurecer ou clarear, brilho, aditivos de pigmentação de cabelo, umectantes, mica, minerais, polifenóis, silicones ou derivados de silicone, bloqueadores de sol,
20 vitaminas, fitomedicinais e outros compostos como listados no International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7th Ed. (1997).

Composições da invenção podem compreender ingredientes ativos que não sejam os heterômeros de arginina. Por exemplo, agentes anti-acne incluindo mas não limitado a ácido salicílico, peróxido de benzoíla, re-
25 sorcinol, e enxofre; anti-oxidantes incluindo mas não limitado ao ácido ascórbico, ácido cafeico, cisteína, hidroquinona e tocoferol; compostos para o tratamento de psoríase incluindo mas não limitado a ácido salicílico, alcatrão de hulha e retinóides; e corticosteróides incluindo mas não limitados a cortisona, hidrocortisona e prednisona.

30 Em algumas modalidades da invenção, os heterômeros de arginina são usados para tratar, aliviar e prevenir o envelhecimento da pele. Lesão na pele devida ao envelhecimento inclui mas não está limitada a rugas

finas e profundas, linhas na pele, fissuras, inchaços, poros abertos, escamação, perda da elasticidade da pele, depressão, perda da firmeza ou dureza da pele, descoloração, regiões hiperpigmentadas tais como sinais da idade e sardas, queratose, diferenciação anormal, hiperqueratinização, elastose, esgotamento do colágeno, e outras mudanças histológicas no estrato córneo, derme, epiderme, o sistema vascular da pele, e os tecidos subjacentes especialmente aqueles perto da pele. O envelhecimento da aging pode ser devido à idade cronológica ou fatores extrínsecos tais como exposição prolongada à luz solar, mas é esperado que as composições da invenção tratem, melhorem ou previnem essas e outras formas de lesões da pele independente do mecanismo de origem.

As composições dessa invenção podem estar na forma de produtos a serem aplicados à pele ou ao epitélio de sujeitos ou pacientes, isto é, seres humanos ou outros mamíferos que poderiam beneficiar-se do tratamento. As composições e os métodos dessa invenção possuem aplicações farmacêuticas e/ou relacionadas com a saúde e podem ser usados para prover o tratamento de várias condições médicas a indivíduos que necessitam ou que podem beneficiar-se deles. Por exemplo, as invenções descritas aqui podem ser usadas no tratamento da hiperidrose, da acne ou de outras condições envolvendo a produção excessiva de secreções ou de suor.

Em geral, as composições dessa invenção são preparadas por meio da mistura do heterômero de arginina com um transportador e habitualmente um ou mais transportadores ou excipientes adicionais farmacêuticamente aceitáveis. O heterômero de arginina está presente nas composições em uma concentração de cerca de 0,001% até uma solução saturada, em algumas modalidades a partir de cerca de 0,01% a cerca de 30% e em outras modalidades a partir de cerca de 0,1% a cerca de 20%. Em sua forma mais simples, as composições dessa invenção podem conter um transportador ou diluente aquoso simples farmacêuticamente aceitável, tal como uma solução salina tamponada. Entretanto, as composições podem conter outros ingredientes típicos em composições farmacêuticas ou ou cosméticas tópicas, isto é, um transportador, um veículo ou um meio farmacêuticamente

aceitáveis, isto é, um transportador, um veículo ou um meio que sejam compatíveis com os tecidos aos quais serão aplicados. O termo "dermatologicamente ou farmaceuticamente aceitável," como é usado aqui, inclui composições ou componentes que são apropriados para uso em contato com tecidos específicos ou para uso em pacientes em geral sem toxicidade, incompatibilidade, instabilidade, e similares indevidas. Quando apropriado, as composições da invenção podem compreender qualquer ingrediente convencionalmente usado nas áreas em consideração, e particularmente em cosmética e dermatologia. As composições também podem incluir uma quantidade de um ânion pequeno, preferivelmente um ânion polivalente, como, por exemplo, fosfato, aspartato ou citrato.

Exemplos

Exemplo 1:

Finalidade:

Desenvolver novas conjugações de arginina, arginina-vitamina C, para melhor fluxo e aumento do benefício terapêutico.

Preparação de Arg- Vitamina C:

Um heterômero de vitamina C e arginina foi preparado através da preparação de uma solução de BocArg(Boc₂)OH (159 mg, 0,33 mmol) em dimetilformamida e adição de cloridrato de etileno (EDC, 70 mg., 0,36 mmol) seguido de 4- dimetilaminopiridina (DMAP, 2 mg, 0,02 mmol). A reação foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente. Uma análise por TLC foi efetuada para verificar o progresso da reação (vide infra). Uma quantidade adicional de 22,7 mg de EDC foi acrescentada, e a reação foi agitada durante 1/2 hora. Observou-se uma mudança da reação para roxo claro. A reação rendeu 44 mg do composto 2. A IR do composto foi efetuada e é mostrada abaixo. MS (ES): 1101,9, 745,6, 645,5, 630,6, 530,6, 502,4

Desproteção da C- Arg (para remover Boc)

Os grupos protetores Boc do composto 2 foram removidos por meio da preparação de uma solução de 25 mg do composto 2 em diclorometano (~10 ml) e adição de ~ 2 ml de ácido trifluoroacético durante a agitação em banho de gelo. A mistura foi agitada durante 1 hora, a seguir foi deixada

aquecer à temperatura ambiente. A TLC (10% de MeOH/diclorometano) depois de 2 horas à temperatura ambiente mostrou uma perda do material de partida e fortalecimento do ponto (produto) de origem. O Composto 4 produziu um ponto ativo UV de R_f modesta nesse sistema de solvente. O solvente foi removido sob pressão reduzida, e o resíduo foi azeotropado duas vezes com tolueno para produzir 25 mg do composto 4.

Resultados:

Esse experimento demonstra a síntese do composto de Arginina- Vitamina C.

10 Exemplo 2:

Procedimento:

Um heterômero de arginina e vitamina D3 foi preparado mediante dissolução de trifosgeno (0,1 g, 0,33 mmol) em 1 ml de cloreto de metileno anidro. A solução de trifosgeno foi adicionada em gotas a uma solução resfriada (0 grau) de vitamina D3 (0,385 g, 1 mmol) e DMAP (0,61 g, 5 mmols) em 2 ml de cloreto de metileno. A mistura da reação foi deixada para agitar a zero grau durante 1,5 hora. A mistura de L-Arginina (0,26 lg, 1,5 mmol) e de N,N-Diisopropiletilamina (523 ul, 3 mmols) foi adicionada em gotas à mistura de trifosgeno. A reação foi deixada para aquecer à temperatura ambiente durante a noite e rendeu 205 mg de sólido branco (35% de rendimento). Esse experimento demonstra a síntese do heterômero de Arginina- Vitamina D3 e a TLC é mostrada na Figura 5.

Exemplo 3:

Eficácia cumulativa in vivo para a distribuição tópica de arginina através da pele murina.

Finalidade:

O potencial de um heterômero de arginina de atravessar a pele e exercer benefícios previamente caracterizados relacionados com a atividade da arginina/NOS foi avaliado ao examinar heterômeros de arginina- vitamina E e de arginina-palmitato em um sistema de modelo animal. Enquanto ambos os heterômeros melhoram a lipossolubilidade relacionada com a arginina isoladamente e devem aumentar o fluxo transdérmico, espera-se

também que o heterômero de vitamina E produza benefícios funcionais adicionais devido às suas propriedades anti-oxidantes.

Preparação:

Os heterômeros de arginina-palmitato e de arginina-vitamina E foram sintetizados a partir da L-arginina (Batelada # 02202JA, A92406-25G, Sigma Aldrich). As soluções de estoque foram preparadas pela adição dos seguintes:

1. Arg-palmitato: 0,9996 g de arginina + palmitato foram dissolvidos em 6 ml de óleo de jojoba (Essential Wholesale, Portland, OR), a seguir diluídos com 6 ml (diluição de 1:1) de creme de Cetaphil.

2. Arg-vitamina E: 0,419 g de arginina + vitamina E foram dissolvidos em 6 ml de H₂O desionizada e a seguir diluídos com 6 ml (diluição de 1:1) de creme de Cetaphil.

3. Cetaphil: preparado com 6 ml de cetaphil apenas.

Tratamentos tópicos de dose diária de alíquotas de 200 µl dosimetradas foram preparados para tratamentos of Arg-palmitato, Arg-vitamina E, ou controle de Cetaphil em tubos de microcentrífuga de 650 µl.

Aplicação Tópica de Compostos de Arginina

Procedimentos do Estudo:

Os animais (6 fêmeas de camundongo C57 preto, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) foram anestesiados através da inalação de isoflurano misturado com oxigênio e, a seguir, injetou-se 0,5 ml coquetel anestésico para roedores (3,75 ml de 100 mg/ml de cetamina, 3,00 ml de 20 mg/ml de Xilazina, e 23,25 ml de solução salina) por via intraperitoneal. Os animais foram suplementados com isoflurano, quando necessário. Cada um dos grupos de tratamento continha 4 camundongos e o grupo de controle 3 camundongos. Uma vez anestesiados, uma área de 2,0 cm x 2,0 cm para dose no dorso de cada camundongo foi cuidadosamente raspada com uma máquina de cortar cabelo no primeiro dia de aplicação do tratamento e os animais foram submetidos a tratamento depilatório na mesma região dorsal usando uma mistura de "rosin" (Surgiwax, Ardell International, Los Angeles, CA). Os animais foram anestesiados através da inalação de isoflurano ape-

nas durante a aplicação de tratamentos em creme hidratante Cetaphil (Galderma, Fort Worth, TX) e receberam doses dosimetradas de 200 µl do tratamento apropriado aplicado à porção cranial da pele preta do dorso (escolhida pelo fato do camundongo não conseguir alcançar essa região com a boca ou as patas). Os animais permaneceram anestesiados durante 1-2 minutos enquanto o tratamento apropriado era aplicado à pele com uma pequena espátula de metal. Os animais recuperaram-se em um ambiente quente controlado para evitar a ocorrência de hipotermia e, uma vez reativos, receberam alimento e água ad libitum durante a noite. Esse procedimento foi repetido uma vez ao dia, na mesma hora aproximada do dia, durante 7 dias. Após o tratamento do dia 7, os camundongos foram submetidos a eutanásia através da inalação de CO₂, e os segmentos de pele tratados foram colhidos em toda a sua espessura por um observador cego dentro de 24 horas após a aplicação do último tratamento. Os segmentos tratados foram divididos em três porções iguais, e a porção cranial foi fixada em 10% de formol tamponado neutro durante 12-16 horas e, a seguir, conservada em 70% de etanol até inclusão em parafina. A porção central foi empregada para Hematoxilina & Eosina para avaliação morfológica e coloração pela Clo-roacetato esterase a fim de avaliar a infiltração por neutrófilos como indicador de inflamação. O segmento caudal tratado foi congelado com ruptura para estudos de solubilização.

Imagem e análise estatística:

Imagens digitais de alta resolução de cada seção foram obtidas usando uma câmera Retiga 1300B (QImaging, Burnaby, BC, Canadá). As imagens foram analisadas usando o software de análise Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Springs, MD) para determinar a avaliação morfológica e expressas na forma de pixels positivos. A média e o erro-padrão foram subsequentemente determinados para cada grupo usando o software Statview (Abacus, Berkeley, CA), com análise da significância em 95% de confiança em séries com sinais de Wilcoxon.

Resultados para a Arg-palmitato e a Arg- vitamina E:

A média, o erro-padrão e valores p estão indicados na Tabela 1

para os grupos de Arg-palmitato, Arg-vitamina E e controle.

Tabela 1. Avaliação morfológica da espessura da derme, comprimento dos pêlos, espessura da epiderme, espessura/densidade da gordura.

5

Tabela 1

	Média	Erro Padrão	Valor P
<u>Derme:</u>			
Arg-palmitato	32596	1398	0,596
Arg-Vitamina E	35779	1425	0,038
Controle	31405	1959	
<u>Cabelo:</u>			
Arg-palmitato	17149	1908	0,668
Arg-Vitamina E	18316	1502	0,044
Controle	15613	1186	
<u>Epiderme:</u>			
Arg-palmitato	11086	749	0,939
Arg-Vitamina E	16475	1513	0,0004
Controle	11082	890	
<u>Gordura:</u>			
Arg-palmitato	27918	2662	0,820
Arg-Vitamina E	21386	1092	0,007
Controle	27419	1849	

Conclusões:

Os heterômeros de arginina exibem um fluxo suficiente através da pele quando aplicados topicamente para produzir vários benefícios terapêuticos relacionados com a arginina e/ou a funcionalidade adicional do heterômero.

10

Exemplo 4:

Finalidade:

O potencial de um heterômero de arginina de atravessar a pele e exercer benefícios previamente caracterizados relacionados com a atividade

de da arginina/NOS foi avaliado através do exame de vários heterômeros de arginina em um sistema de modelo humano. Todos os heterômeros melhoraram a lipossolubilidade relativa à arginina isoladamente e devem aumentar o fluxo transdérmico e a perfusão.

5 Procedimento:

Modificação da sonda de fluxômetro e formulações de heterômeros de arginina

Formulações de bálsamo para lábios foram obtidas consistindo em Lanolina Anidra USP, Etil Metilfenilglicidato, Ésteres de Cetil, D-Alfa Tocoferil Acetato USP, Petrolato USP, Ácido Salicílico USP, Benzil Cinamato e 4,0 mg/ml de L-Arg(9) (um oligômero consistindo em nove argininas), L-Arg-E, L-Arg-D3 ou L-Arg-Palma (ABBE Labs, Farmingdale, NY). Além disso, um tratamento de controle foi obtido compreendendo 100% de geléia de petrolato branco (Unilever, Greenwich, CT). Foi usada uma solução aquosa de L-Arg em uma concentração de 50 mg/ml (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO). A ponta da sonda de um Fluxômetro por Laser Doppler Transônico da Série BLF 21 (Transonic Systems, Ithaca, NY) foi implantada em um bandó de elástico usado em volta da cabeça, de tal modo que a sonda ficou ligeiramente fixada em uma seção da pele no meio da frente do sujeito.

20 Tratamento da frente

A temperatura da frente foi normalizada antes do tratamento pelo uso do bandó modificado durante cinco minutos. Uma formulação de bálsamo para lábios ou um controle foram então aplicados com um aplicador com ponta de algodão à área da pele em contato com a sonda. As leituras de perfusão tecidual foram registradas a cada 30 segundos durante 5 minutos (n = 55 por tratamento) começando um minuto após a aplicação.

Análise Estatística

A média e o erro-padrão foram avaliados usando Statview (Abacus Concepts, Berkeley, CA), sendo as comparações efetuadas usando medidas repetidas ANOVA e a significância determinada a 95% com teste post-hoc usando Fisher PLSD ou o teste F de Scheffe. Todos os procedimentos e as análises foram efetuados por observadores cegos.

Resultados da perfusão da frente:

A média, o erro-padrão e os valores p são mostrados na Tabela 2 para grupos de heterômeros de arginina e controle. A Figure 6 mostra os efeitos de heterômeros de arginina topicamente aplicados sobre a perfusão da frente humana para grupos de heterômeros de arginina e controle.

Tabela 2. Avaliação da perfusão da frente em unidades de perfusão tecidual após tratamento tópico com heterômeros de arginina.

Tabela 2

	Média	Erro Padrão	Valor P
L-Arg-D ₃	13,727	0,9956	p<0,05
L-Arg-Palm	10,800	0,7188	p<0,05
L-Arg(9)	9,198	0,4003	p<0,05
L-Arg-E	8,016	0,5719	p<0,05
L-Arg Aquoso (50 mg/ml)	9,184	0,3009	p<0,05
Controle	4,987	0,0621	

Conclusão:

- 10 Todos os heterômeros causaram aumentos estatisticamente significativos na perfusão em relação ao controle de base. A L-Arg-D₃ e a L-Arg-Palm exibiram aumentos de 175% e 117%, respectivamente, na perfusão tecidual em relação ao controle de base. De modo encorajador, constatamos que todos os heterômeros apresentam maior solubilidade e fluxo através da pele, enquanto todos, menos a L-Arg-E, exibem aumento da perfusão
- 15 após a sua aplicação tópica. Os heterômeros de arginina apresentam um fluxo suficiente através da pele quando aplicados topicamente para produzir vários benefícios terapêuticos relacionados com a arginina e/ou a funcionalidade adicional do heterômero.

REIVINDICAÇÕES

1. Heterômero de fórmula I:



em que A é arginina covalentemente ligada a um segundo composto R de tal forma que o grupo guanadino da arginina permanece não reagido, e, em que R é uma molécula orgânica, em que o heterômero tem um fluxo maior sobre a pele do que a arginina sozinha.

2. Heterômero de acordo com a reivindicação 1, em que R é uma vitamina.

3. Heterômero de acordo com a reivindicação 2, em que R é vitamina C.

4. Heterômero de acordo com a reivindicação 2, em que R é vitamina E.

5. Heterômero de acordo com a reivindicação 2, em que R é vitamina D.

6. Heterômero de acordo com a reivindicação 1, em que R é um ácido graxo.

7. Heterômero de acordo com a reivindicação 6, em que R é ácido palmítico.

8. Heterômero de acordo com a reivindicação 1, em que R é um retinoide.

9. Composição como definida na reivindicação 1, em que A e R estão ligados por uma ligação de amida.

10. Heterômero de acordo com a reivindicação 1, em que A e R estão ligados por uma ligação de éster.

11. Composição compreendendo um heterômero de fórmula I



em que A é arginina covalentemente ligada a um segundo composto R de tal forma que o grupo guanadino da arginina permanece não reagido e, em que R é uma molécula orgânica, em que o heterômero tem um fluxo maior sobre a pele do que a arginina sozinha.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, em que R é

uma vitamina.

13. Composição de acordo com a reivindicação 12, em que R é vitamina C.

5 14. Composição de acordo com a reivindicação 12, em que R é vitamina E.

15. Composição de acordo com a reivindicação 12, em que R é vitamina D.

16. Composição de acordo com a reivindicação 11, em que R é um ácido graxo.

10 17. Composição de acordo com a reivindicação 16, em que o ácido graxo é ácido palmítico.

18. Composição de acordo com a reivindicação 11, em que R é um retinoide.

15 19. Composição de acordo com a reivindicação 11, em que A e R são ligados por uma ligação de éster.

20. Composição de acordo com a reivindicação 11, em que A e R são ligados por uma ligação de amida.

21. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda preparações para tratamento da pele.

20 22. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda preparações para banho.

23. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda preparações de cosméticos.

25 24. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda preparações para cuidados com os olhos.

25. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda preparações para cuidados com os lábios.

26. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda preparações de filtros solares.

30 27. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda preparações para tratamento dos cabelos.

28. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo

dendo ainda preparação anti-acne.

29. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda preparações anti-oxidantes.

5 30. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda preparações anti-psoríase.

31. Composição de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda preparações de corticosteroides.

32. Método para prover um efeito benéfico para a pele compreendendo: aplicar topicamente uma composição compreendendo um heterô-
10 mero de fórmula I:



em que A é arginina covalentemente ligada a um segundo composto R de tal maneira que o grupo guanadino da arginina permanece não reagido e, em que R é uma molécula orgânica, em que o heterômero tem um fluxo maior
15 sobre a pele do que a arginina sozinha.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o efeito benéfico é promover angiogênese nos folículos do cabelo.

34. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o efeito benéfico é reduzir os sinais de envelhecimento da pele.

20 35. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o efeito benéfico é reduzir os sintomas de acne.

36. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o efeito benéfico é reduzir ou prevenir o dano causado pela exposição da pele à luz solar.

25 37. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o efeito benéfico é reduzir a aparência de linhas finas e rugas na pele.

38. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o efeito benéfico é reduzir as secreções glandulares.

30 39. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o efeito benéfico é prover um antioxidante para a pele.

40. Método de acordo com a reivindicação 32, em que a composição é aplicada para suavizar a textura da pele.

41. Método de acordo com a reivindicação 32, em que a composição é aplicada para prover umidade e benefício lubrificante na pele.

42. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o segundo composto é ácido palmítico.

5 43. Método de acordo com a reivindicação 42, em que a composição é aplicada para suavizar e textura da pele.

FIG 1

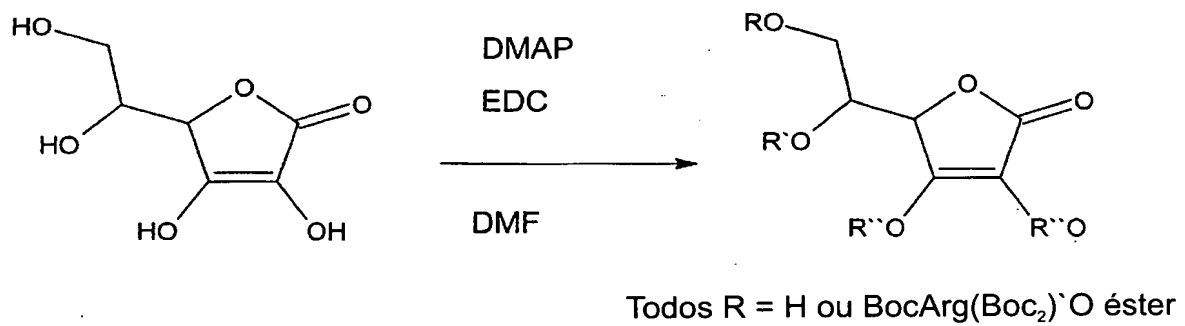


FIG 2

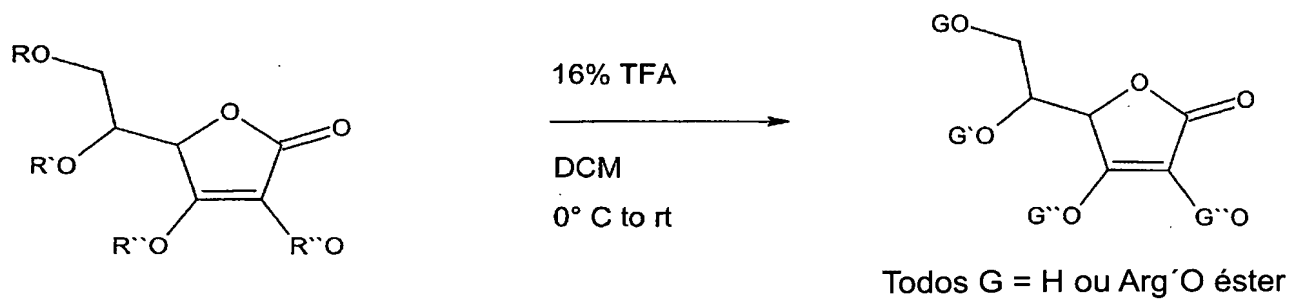


FIG 3

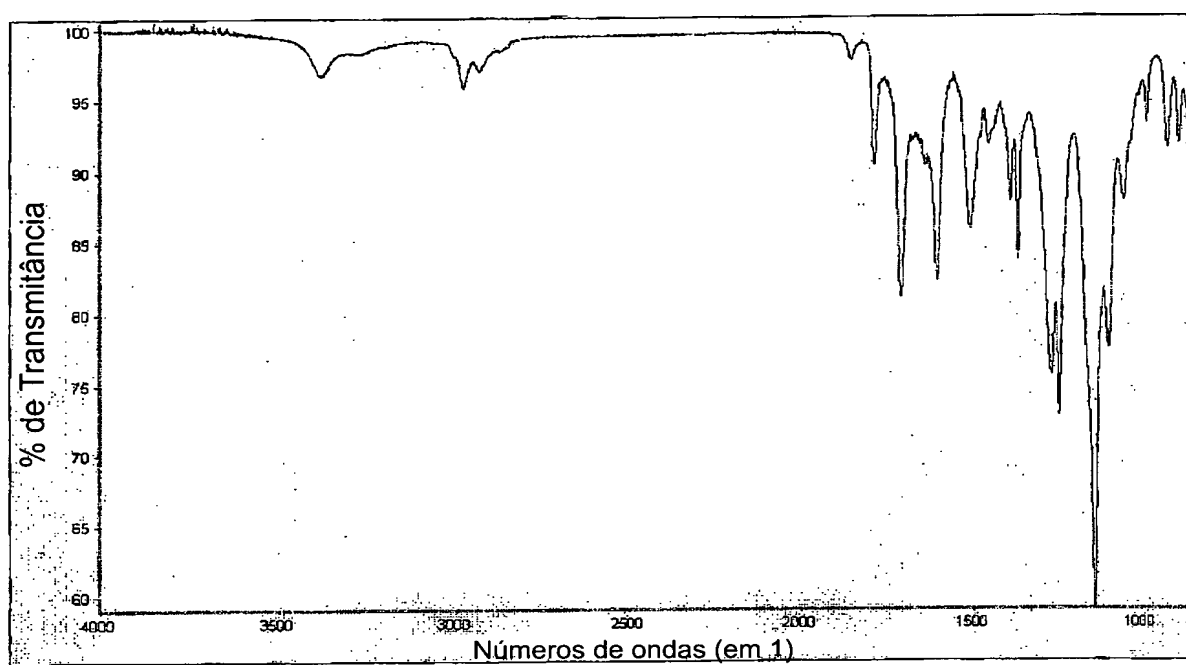


FIG 4

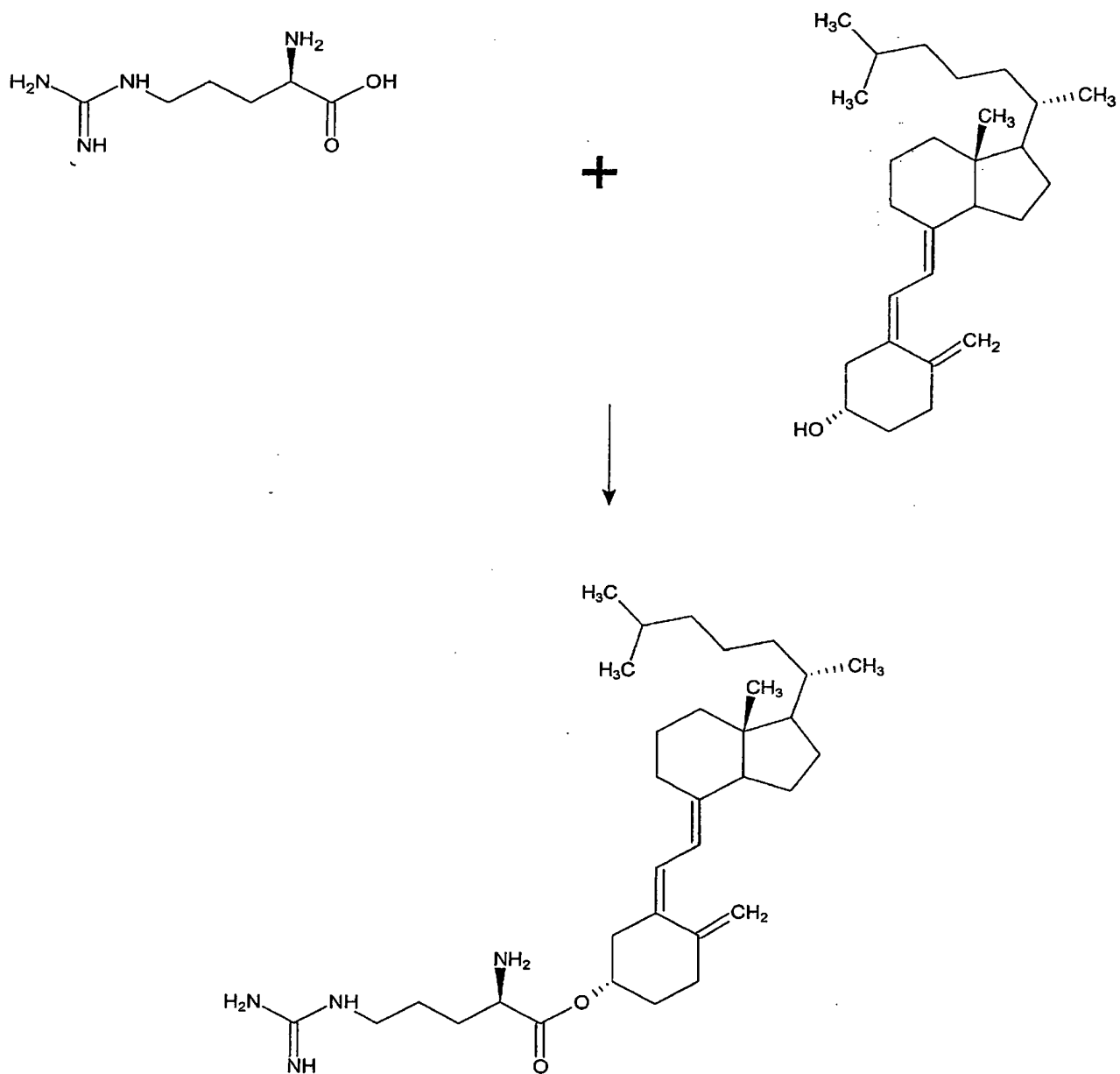


FIG 5

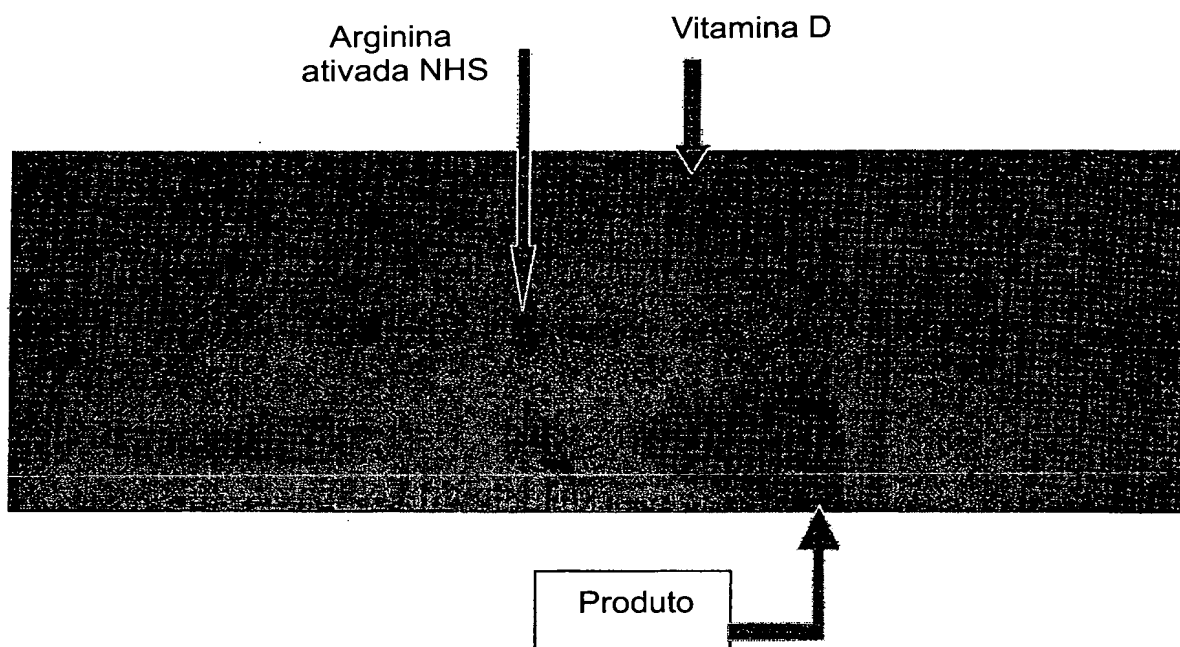
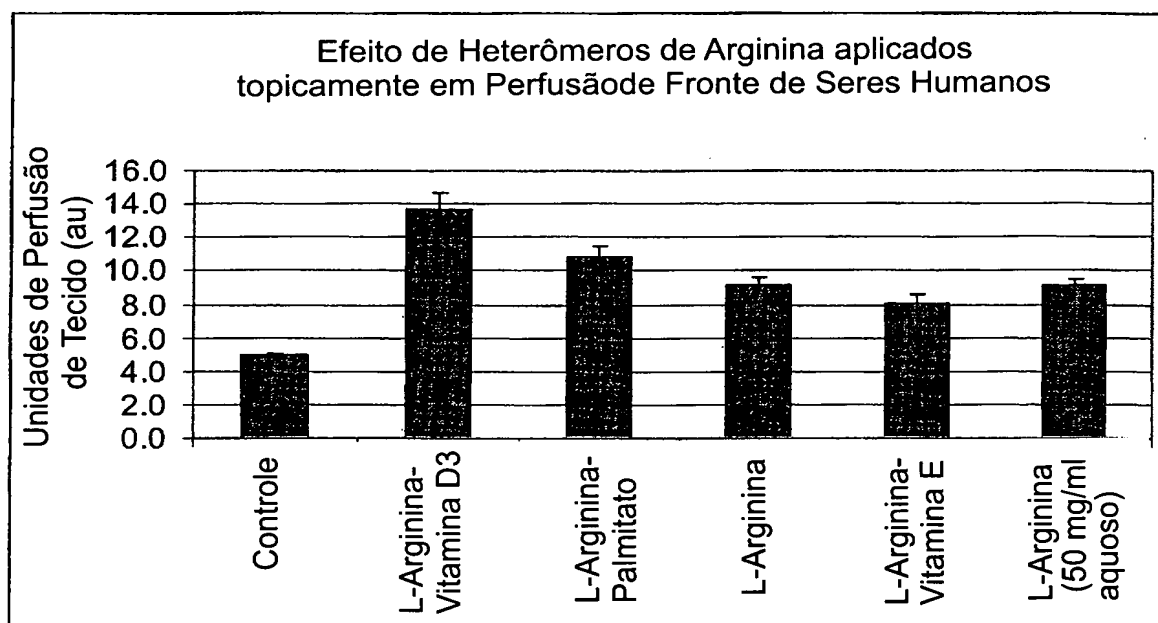


FIG 6



RESUMO

Patente de Invenção: "HETERÔMEROS DE ARGININA PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA".

A presente invenção refere-se a uma estratégia para prover benefício terapêutico ou cosmético para a pele aplicando topicamente arginina quimicamente ligada a um segundo composto (não oligo-arginina) a fim de aumentar a distribuição transepitelial de arginina sobre a pele, através de uma combinação de solubilidade e fluxo aumentados. Os heterômeros de arginina da invenção podem adicionar propriedades complementares ou benéficas para a pele além daquelas que são relacionadas à arginina.