

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 216**

51 Int. Cl.:

A61K 8/362 (2006.01)
A61K 8/44 (2006.01)
A61K 31/085 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61K 31/194 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2009 PCT/EP2009/067416**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2010 WO10070049**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09795417 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2376056**

54 Título: **Formulaciones cosméticas y farmacéuticas de moléculas de calixarenos**

30 Prioridad:

17.12.2008 FR 0858703

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT DE RADIOPROTECTION ET DE
SÛRETÉ NUCLÉAIRE (100.0%)
31 Avenue de la Division Leclerc
92260 Fontenay aux Roses, FR**

72 Inventor/es:

**SPAGNUL, AURÉLIE;
REBIERE, FRANÇOIS;
PHAN, GUILLAUME;
BOUVIER-CAPELY, CÉLINE y
FATTAL, ELIAS**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 639 216 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

Formulaciones cosméticas y farmacéuticas de moléculas de calixarenos.

5 La invención se refiere al campo de los tratamientos de las contaminaciones cutáneas por los actínidos.

10 Las actividades de la industria nuclear necesitan cada año la manipulación de decenas de miles de toneladas de uranio durante diversas etapas de tratamiento del combustible nuclear: extracción de las minas uraníferas, purificación química, enriquecimiento isotópico, fabricación de los elementos combustibles, retratamiento del combustible irradiado, seguimiento de su depósito y almacenamiento. El uranio o los actínidos transuranianos (plutonio o americio por ejemplo) son así manipulados en las instalaciones implicadas en el ciclo del combustible, pero también dentro de los laboratorios de investigación que trabajan tanto aguas arriba como aguas abajo del ciclo.

15 Con el fin de asegurar la protección de los trabajadores del sector nuclear, la exposición a las radiaciones ionizantes asociada a una práctica debe ser la más baja posible. Para ello, los lugares de exposición potencial están sometidos a importantes restricciones técnicas que permiten así asegurar una vigilancia tanto en la exposición a la irradiación externa (balizas de alarma y, dosímetro individual) como sobre la contaminación interna (aparatos de extracción de aerosoles, antropo-radiometría pulmonar, determinación del uranio urinario y fecal) de los trabajadores potencialmente expuestos [1]. Sin embargo, a pesar de los medios de protección utilizados en el puesto de trabajo, se registra un cierto número de accidentes de exposición del trabajador nuclear. Las principales vías de incorporación de los actínidos en el organismo son la inhalación, la ingestión y la vía cutánea (contaminación surfática y/o herida).

25 La contaminación por herida sigue siendo muy preocupante ya que puede ser el origen de una contaminación interna significativa y duradera de los individuos después de la transferencia de los actínidos en el organismo. En efecto, en el caso de una herida accidental que conlleva una contaminación por los actínidos tales como los compuestos solubles de uranio, la transferencia de los actínidos a través de una piel excoriada y por lo tanto la resorción por circulación sanguínea puede aparecer muy rápidamente (30 minutos). Además, si la contaminación de una herida superficial es sólo parcial, el uranio sigue estando biológicamente disponible ya que la epidermis viable se comporta como un depósito de uranio [2]. Se observan entonces a nivel cutáneo unos efectos citotóxicos denominados precoces. El uranio transita después en el organismo por medio de la circulación sistémica y una primera parte de este uranio se elimina por excreción urinaria. La cantidad de radioelemento que se queda en el organismo se deposita a nivel de dos principales órganos dianas que son los riñones y el esqueleto. Unos efectos denominados diferidos pueden manifestarse entonces a nivel de estos órganos, demostrando así la toxicidad química y radiológica a largo plazo del uranio en particular para el caso de los compuestos más activos (uranio enriquecido) [2-4].

40 Los métodos actuales de descontaminaciones cutáneas consisten, después de la transferencia de los individuos al servicio médico, en limpiar la piel con la ayuda de una solución desinfectante adaptada adicionada con agente quelante, tal como el ácido Dietileno Triamina Penta Acético (DTPA) al 25% por ejemplo, en el caso de las heridas por llaga. La limpieza de las heridas puede ser completada después por extirpación quirúrgica de los tejidos contaminados en caso de contaminaciones por partículas. En el caso de compuestos solubles del uranio, es importante subrayar el hecho de que el plazo entre el momento de la contaminación y la llegada al servicio médico (quince minutos como media) es suficiente para permitir una difusión del uranio a través de la capa córnea de la epidermis, lo cual conduce a la formación de un depósito de uranio que podrá difundirse después más profundamente [5].

50 Ahora bien, no existe ninguna medida de urgencia alternativa que permita impedir o limitar de manera satisfactoria la transferencia de los actínidos a través de una herida en el momento y en el lugar del accidente. Además, los agentes quelantes disponibles en clínica tal como el DTPA no son capaces de complejar selectivamente los compuestos de uranio y su eficacia sigue siendo muy limitada en medio biológico.

55 La terapia elegida en caso de contaminación interna por los actínidos consiste después en inyectar a la víctima por vía sistémica unas soluciones que contienen unos agentes que eliminan los elementos radiactivos acelerando la eliminación urinaria de los actínidos incorporados (por ejemplo solución de DTPA para Pu y Am). Como la solución de DTPA no es eficaz para la eliminación del uranio, se han propuesto otros agentes de eliminación potencialmente eficaces tales como unos ligandos catecolatos (CAM) e hidroxipiridonatos (HOPO), pero no están todavía clínicamente aceptados [6, 7]. El ligando etano-1-hidroxi-1,1-bifosfonato (EHBP) es también tan buen agente complejante del uranio como HOPO y CAM y presenta la ventaja de ser ya utilizado clínicamente en otras indicaciones [8]. Sin embargo, la acción eliminadora de estos agentes depende en gran medida del tiempo pasado entre el momento de la contaminación y la inyección [8].

65 Al final, la ausencia de medida de urgencia a administrar en el momento y en el lugar del accidente constituye un vacío que convendría llenar con el fin de limitar la penetración potencial de los actínidos en el organismo a partir de la herida o de la superficie de contaminación cutánea. La búsqueda de un agente de descontaminación que

tiene como objetivo reducir el flujo transcutáneo de los actínidos tras una contaminación por contacto o por herida es un tema de actualidad sobre el cual se han llevado a cabo un número relativamente restringido de trabajos [3, 4, 9-11].

5 La solicitud WO 2006/123051 describe la utilización de los p-terc-butilcalix[6]arenos fijados sobre un soporte para complejar selectivamente el uranio, el americio y el plutonio de la orina.

La solicitud WO 95/19974 describe la utilización de los calix[3] a [8]arenos para el tratamiento de las infecciones bacterianas o fúngicas, del VIH y del cáncer.

10 La solicitud US nº 5.441.983 describe la utilización de calix[6]arenos para el tratamiento de infecciones virales y del cáncer.

15 La solicitud FR 2 782 007 describe la utilización de calix[6]arenos para el tratamiento de las enfermedades fibróticas.

La solicitud WO 02/44121 describe la utilización de calix[4]arenos para el tratamiento de infecciones virales.

20 El documento Archimbaud M *et al.* (Radiation Protection Dosimetry, Nuclear Technology Publishing, vol 53, nº 1-4; 1 de enero de 1994) describe la utilización de los calixarenos para la eliminación del uranio en ratas por vía intraperitoneal.

25 La solicitud WO 2004/085442 describe la utilización de los calixarenos para la desintoxicación de pacientes tras una intoxicación causada por metales pesados o medicamentos.

La solicitud WO 03/024583 describe unas composiciones coloidales dispersables que comprenden nanopartículas de calixarenos anfífilos que transportan unos agentes activos para liberarlos en contacto con la piel.

30 Ninguno de estos documentos describe la utilización de los calixarenos para una administración por vía tópica para el tratamiento de las contaminaciones cutáneas por actínidos.

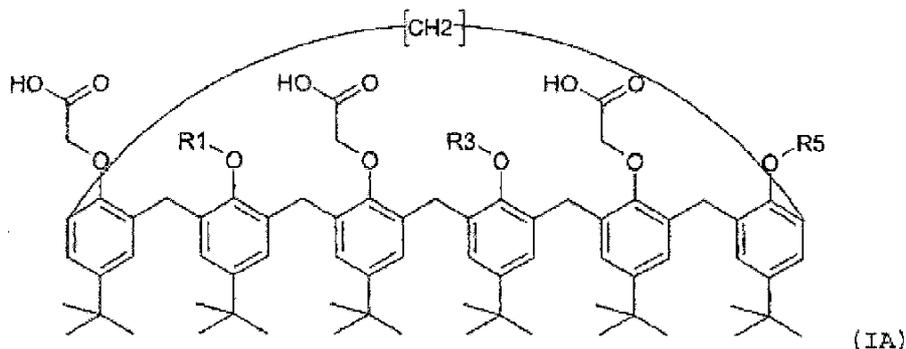
35 Los calixarenos son unas jaulas complejantes particulares. En 1993, Araki *et al.* han mostrado las propiedades complejantes en extracción líquido-líquido, del 1,3,5-O-trimetil-2,4,6-O-triacido carboxílico-para-tercio-butil-calix[6]-areno (molécula representada a continuación por la fórmula IA), frente al uranio (Chem. Lett., 829-832, 1993). En 1994, Van Duynoven *et al.* han utilizado la misma molécula para estudiar sus equilibrios conformacionales (J. Am. Chem. Soc., 116, 5814-5822). En 1997, C. Dinse *et al.* (Radioprotection, 32 nº5, 659-671) han demostrado la selectividad, en extracción líquido-líquido de la molécula de fórmula (IA) siguiente, frente al uranio en presencia de plutonio y sodio.

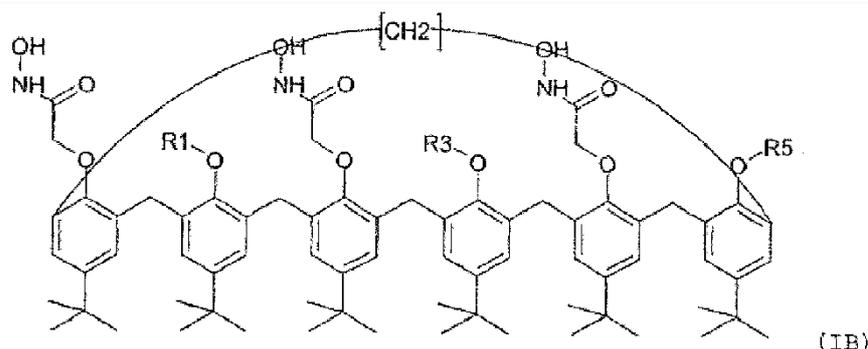
40 Ninguno de los productos o técnicas de la técnica anterior permiten proponer una medida tópica de urgencia con el fin de limitar, incluso suprimir, la penetración en el organismo de los actínidos a partir de una contaminación cutánea.

45 De manera sorprendente, los inventores han mostrado que una nanoemulsión aceite en agua que comprende p-terc-butil-calix[6]arenos en la fase oleosa permite fijar el uranio e impedir su difusión transdérmica.

50 La presente invención tiene así por objeto una composición dermatológica o dermatocósmica según el objeto de la reivindicación 1 que comprende un calixareno, preferentemente un calix[6]areno para su utilización en el tratamiento de las contaminaciones cutáneas por actínidos.

Ventajosamente, el calixareno según la invención es un para-tercio-butil calix[6]areno de fórmula (IA) o (IB):





en las que R1, R3 y R5, idénticos o diferentes, representan cada uno independientemente:

- 5 (i) un átomo de hidrógeno, o de halógeno,
- (ii) un radical acetilo, amino, fosfato, nitro, sulfato, carboxi, carboxílico, tiocarboxi, carbamato, tiocarbamato,
- 10 (iii) un alquilo lineal o ramificado, que tiene 1 a 60, preferentemente 1 a 30 átomos de carbono, eventualmente sustituido, que presenta eventualmente por lo menos una insaturación etilénica o acetilénica,
- (iv) un cicloalquilo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono, eventualmente sustituido, que presenta eventualmente por lo menos una insaturación etilénica o acetilénica,
- 15 (v) un arilo, un naftilo, un aril-(alquilo de C1-C30), un (alquilo de C1-C30)-arilo, eventualmente sustituidos,
- pudiendo los radicales (ii) a (v) ser sustituidos por unos átomos de halógeno, unos órgano-metálicos, unas funciones alcoholes, aminadas, ácidos o ésteres carboxílicos, sulfónicos, sulfúricos, fosfóricos, fosfónicos o hidroxámicos, carbamatos, tiocarbamatos, éteres, tioles, epóxidos, tioepóxidos, isocianatos, isotiocianatos o un carbono de estos radicales que puede ser sustituido por un heteroátomo de nitrógeno, azufre, fósforo, oxígeno, boro, arsénico;
- 20 (vi) un polisacárido.
- 25

Según un modo de realización ventajoso, en la fórmula (IA) o (IB), dos de entre R1, R3 y R5 representan hidrógeno o metilo, siendo el tercero un polisacárido.

30 Ventajosamente, dichos polisacáridos se seleccionan de entre el grupo constituido por los dextranos, por el quitosano y por las agarosas.

Según otro modo de realización ventajoso, los para-tercio-butil calix[6]arenos de la invención son unos compuestos de fórmula (IA) o (IB) en las que R1, R3 y R5 son idénticos y preferentemente representan un hidrógeno.

35 Otro objeto de la presente invención es la utilización de un calixareno para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de las contaminaciones cutáneas por actínidos.

40 Otro objeto de la presente invención es un método de tratamiento de las contaminaciones cutáneas por actínidos que comprende la aplicación sobre la piel de una cantidad eficaz de calixareno.

45 La serie química de los actínidos comprende los elementos químicos de la tabla periódica que se sitúan entre el actinio y el lawrencio, que poseen por lo tanto un número atómico entre 89 y 103 incluidos, es decir el actinio (Ac), el torio (Th), el protactinio (Pa), uranio U, neptunio Np, plutonio Pu, americio Am, curio Cm, berkelio Bk, californio Cf, einstenio Es, fermio Fm, mendelevio Md, nobelio No, lawrencio (Lw).

Los actínidos son todos unos elementos radioactivos y reciben su nombre del actinio (Z=89), un metal pesado, ya que posee unas propiedades químicas parecidas.

50 El actínido producido más abundantemente en el ciclo de combustible nuclear es el plutonio, con su principal isótopo a la cabeza, el plutonio-239, también fisible. Pero los reactores nucleares generan, en menor cantidad, otros actínidos denominados "menores" por esta razón. Los principales son el neptunio-237, los americio-241 y 243 y los curio-244 y 245. Los actínidos menores constituyen con los productos de fisión una gran parte de los desechos radioactivos de alta actividad y larga duración de vida (HALV), es decir los desechos de la industria

electronuclear más peligrosos.

Ventajosamente, la invención se utiliza para el tratamiento de las contaminaciones cutáneas por uranio, plutonio y/o americio.

5 Otro objeto de la presente invención es la utilización de los calixarenos, ventajosamente unos calix[6]arenos, para impedir o limitar la transferencia de un actínido en el organismo a partir de un sitio de contaminación cutánea, ventajosamente para impedir o limitar la transferencia de uranio, plutonio y/o americio en el organismo a partir de un sitio de contaminación cutánea.

10 La invención permite en efecto proponer una composición dermocosmética que permitirá impedir la penetración de los actínidos en el organismo a partir de un sitio de contaminación cutánea o limitar la cantidad de actínido que penetra en el organismo a una cantidad insuficiente para iniciar un síntoma relacionado con la contaminación, en particular un síntoma renal u óseo.

15 Otro objeto de la presente invención es una composición dermocosmética que comprende uno o varios compuestos calixareno como principio activo y uno o varios excipientes cosméticamente aceptables.

20 La expresión "composición dermocosmética" significa composición cosmética destinada a una aplicación sobre la piel.

Otro objeto de la presente invención es una composición dermatológica que comprende uno o varios compuestos calixareno como principio activo y uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 La expresión "composición dermatológica" significa composición farmacéutica destinada a una aplicación sobre la piel.

Ventajosamente, los excipientes de la formulación según la invención se seleccionan de acuerdo con la farmacopea francesa.

30 Ventajosamente, los excipientes de la formulación dermocosmética o dermatológica según la invención no constituyen unos promotores de penetración cutánea que podrían desorganizar la estructura cutánea y promover la penetración cutánea de los actínidos contaminantes.

35 Dado el fuerte carácter lipófilo de las moléculas de calixareno, la composición dermocosmética o dermatológica según la invención se presenta ventajosamente en una forma que comprende una fase oleosa, encontrándose el o los compuestos calixarenos en la fase oleosa como:

- 40 - un oleogel cuya base es un aceite;
- una pasta anhidra cuya base es una fase grasa sólida o una cera;
- 45 - una emulsión aceite en agua (O/W) constituida por la dispersión de gotitas de aceite en agua o agua en aceite (W/O) constituida por la dispersión de gotitas de agua en la fase oleosa.

Ventajosamente, la composición dermocosmética o dermatológica según la invención es una nanoemulsión aceite en agua o agua en aceite, preferentemente una nanoemulsión aceite en agua.

50 Se denomina "nanoemulsión" una emulsión cuyo tamaño de gotitas está comprendido entre 50 y 200 nm.

La emulsión, y en particular la nanoemulsión (diámetro medio de las gotitas dispersadas inferior al micrómetro), resultó ser una formulación particularmente ventajosa ya que es poco remanente y por lo tanto fácilmente lavable, permitiendo así considerar una descontaminación más eficaz. Además, es susceptible de asegurar una mejor disponibilidad de los calixarenos en la superficie de la piel y presenta una gran superficie total desarrollada gracias a las gotitas de aceite finamente dispersadas en la fase acuosa.

55 Ventajosamente, una composición dermocosmética o dermatológica según la invención en forma de nanoemulsión presenta unas gotitas de tamaño comprendido entre 50 y 200 nm, preferentemente entre 100 y 200 nm.

60 Ventajosamente, la fase oleosa está compuesta por aceites minerales, vegetales, de síntesis o una de sus mezclas. Preferentemente, la fase oleosa comprende parafina. De manera particularmente preferida, la fase oleosa está constituida por parafina.

65 Ventajosamente, por lo menos uno de los compuestos calix[6]areno presentes en la composición dermatológica según la invención a título de principio activo presenta la fórmula (IA) o (IB) tal como se han definido

anteriormente en las que R1, R3 y R5 tienen las definiciones dadas anteriormente.

5 Preferentemente, todos los compuestos calix[6]areno presentes en la composición dermatológica según la invención a título de principio activo presentan la fórmula (IA) o (IB) tal como se han definido anteriormente en las que R1, R3 y R5 tienen las definiciones dadas anteriormente.

10 Preferentemente, la composición dermatológica según la invención comprende del 50 al 95%, preferentemente del 70 al 80% de agua. Preferentemente, la composición dermatológica según la invención comprende del 5 al 50%, preferentemente del 15 al 25% de fase oleosa. Preferentemente, la composición dermatológica según la invención comprende del 1 al 15% de tensioactivos. Ventajosamente, la composición dermatológica según la invención comprende de 2 a 30 mg, preferentemente 2 a 12 mg de calix[6]areno por gramo de la composición. Cuando la composición dermatológica según la invención es una nanoemulsión, ésta comprende 2 a 30 mg, preferentemente 2 a 12 mg de calix[6]areno por gramo de la composición.

15 Ventajosamente, por lo menos uno de los compuestos calixareno presentes en la composición dermocosmética según la invención es un calix[6]areno.

20 Preferentemente, todos los compuestos calixareno presentes en la composición dermocosmética según la invención a título de principio activo son unos calix[6]areno.

Ventajosamente, por lo menos uno de los compuestos calixareno presentes en la composición dermocosmética según la invención a título de principio activo presenta la fórmula (IA) o (IB) tal como se han definido anteriormente en las que R1, R3 y R5 tienen las definiciones dadas anteriormente.

25 Preferentemente, todos los compuestos calixareno presentes en la composición dermocosmética según la invención a título de principio activo presentan la fórmula (IA) o (IB) tal como se han definido anteriormente en las que R1, R3 y R5 tienen las definiciones dadas anteriormente.

30 Preferentemente, la composición dermocosmética según la invención comprende del 50 al 95%, preferentemente del 70 al 80% de agua. Preferentemente, la composición dermocosmética según la invención comprende del 5 al 50%, preferentemente del 15 al 25% de fase oleosa. Preferentemente, la composición dermocosmética según la invención comprende del 1 al 15% de tensioactivos. Ventajosamente, la composición dermocosmética según la invención comprende 2 a 30 mg, preferentemente 2 a 12 mg de calixareno por gramo de la composición. Cuando la composición dermocosmética según la invención es una nanoemulsión, ésta comprende 2 a 30 mg, preferentemente 2 a 12 mg de calixareno por gramo de la composición.

Figuras

40 Figura 1: Esquema de una emulsión aceite en agua,

Figura 2: Modo de realización de las nanoemulsiones,

45 Figura 3: Evolución del tamaño de las gotitas oleosas dispersadas en función de la concentración en calixareno en las nanoemulsiones,

Figura 4: Evolución del potencial zeta de las gotitas oleosas en función de la concentración en calixareno en la emulsión (A). Hipótesis de localización de moléculas de calixareno en la superficie de las gotitas de aceite de la emulsión (B),

50 Figura 5: Evolución del pH de las emulsiones en función de la concentración en calixareno incorporada (A). Hipótesis de localización de moléculas de calixareno en la superficie de las gotitas de aceite de emulsión (B),

55 Figura 6: Porcentaje de uranio retenido por el filtro del sistema de ultrafiltración en función de la concentración en uranio depositado,

Figura 7: Distribución del uranio entre el retenido, el filtro y el filtrado después de la ultrafiltración (A). Representación del sistema de ultrafiltración (B),

60 Figura 8: Porcentaje de uranio extraído en función del tiempo de contacto entre la solución contaminante y la nanoemulsión así como en función del tipo de contacto (dinámica y estática). Observación: tiempo de contacto representado = duración real del experimento + 30 minutos de ultrafiltración

65 Figura 9: Porcentaje de uranio extraído en función del tiempo de contacto entre la solución contaminante y la dispersión del calixareno en aceite de parafina así como en función del tipo de contacto (dinámica y estática). Observación: tiempo de contacto representado = duración real del experimento + 20 minutos de ultrafiltración

Figura 10: Esquemas de las células de Franz utilizadas para el estudio del paso transcutáneo del uranio o de las moléculas de calixareno a partir de las formulaciones.

Figura 11: Cinética de difusión transcutánea del uranio sobre 24 horas en células de Franz (n=5), en ausencia o en presencia de nanoemulsión de calixareno.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitar su alcance.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de una nanoemulsión aceite en agua de calix[6]areno

Se prepara una nanoemulsión aceite en agua, en la que las moléculas de calixareno son incorporadas en la fase oleosa. Estas nanoemulsiones están constituidas por un aceite mineral (aceite de parafina), por tensioactivos no iónicos (Tween 80® y Span 80®), por agua MilliQ y por 1,3,5-OMe-2,4,6-OCH₂COOH-p-ter-butilcalix[6]areno. Las proporciones másicas de tensioactivos, de aceite y de agua se han fijado respectivamente al 5%, al 20% y al 75%. La proporción másica relativa de los dos tensioactivos se ha optimizado con el fin de obtener las condiciones óptimas de emulsificación (balance hidrófilo-lipófilo HLB=11).

Las nanoemulsiones de calixareno se han preparado según el método de inversión de fase. La fase oleosa de la emulsión que corresponde a la mezcla aceite-calixareno-tensioactivos y la fase acuosa se colocan en un primer tiempo separadamente en un baño termostataado a 50°C bajo agitación suave durante treinta minutos. Una vez transcurrido este plazo de equilibrado en temperatura, la fase acuosa se añade gota a gota a la fase oleosa bajo agitación suave (figura 2). Las nanoemulsiones así obtenidas se conservan bajo agitación en el baño termostataado durante 45 minutos y después se colocan bajo agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las nanoemulsiones se conservan después a temperatura ambiente protegidas de la luz.

Ejemplo 2: Caracterización de las nanoemulsiones obtenidas en el ejemplo 1

Las nanoemulsiones se han caracterizado por medición del tamaño de las gotitas oleosas dispersadas, del potencial zeta (carga global de superficie que las gotitas adquieren en el medio acuoso) y del pH. El sentido de las emulsiones también se ha verificado por conductimetría y por el ensayo de dilución de la emulsión en agua.

El tamaño medio de las gotitas oleosas dispersadas así como el índice de polidispersabilidad (PDI) que refleja la homogeneidad de la distribución de tamaño se ha medido por espectroscopia de correlación de fotones.

Este estudio ha mostrado que el diámetro de los glóbulos oleosos es inferior a 200 nm y que disminuye de manera significativa ($p < 0,05$) cuando la cantidad de calixareno introducida es superior a 2 miligramos por gramo de emulsión (figura 3). Esta disminución de tamaño está correlacionada con un aumento significativo ($p < 0,05$) del índice de polidispersabilidad, traduciendo así una disminución de la homogeneidad de las emulsiones. Sin embargo, el valor del PDI sigue siendo bajo ($< 0,250$), lo cual indica que la distribución de tamaño de las gotitas oleosas sigue siendo homogénea para unas nanoemulsiones cargadas en calixareno hasta 8 mg/g.

El potencial zeta se ha determinado por medición de la movilidad electroforética de los glóbulos oleosos dispersos,

Esta medición ha permitido poner en evidencia la presencia de calixareno en la superficie de estas gotitas (figura 4). En efecto, el aumento de la concentración en calixareno en las nanoemulsiones conlleva una disminución de la carga de superficie de las gotitas oleosas hasta la concentración de 4 mg/g, concentración más allá de la cual el potencial zeta tiende a estabilizarse. Esta estabilización se puede explicar por una probable desprotonación de moléculas de calixareno que se encontrarían en superficie de los glóbulos oleosos.

La presencia de calixareno en la superficie de las gotitas oleosas dispersadas también se ha puesto en evidencia por medición pH-métrico. La comparación de los pH de emulsiones no cargadas en calixareno y de emulsiones cargadas a 2, 4, 6 y 8 mg/g ha mostrado una disminución de pH de aproximadamente una unidad en presencia del agente quelante. Este fenómeno se explicaría por una desprotonación de moléculas de calixareno presentes en la superficie de los glóbulos oleoso (figura 5).

Ejemplo 3: Eficacia *in vitro* de las nanoemulsiones de calixareno para la descontaminación

La eficacia de las nanoemulsiones de calixareno se ha evaluado *in vitro* mediante la utilización de la técnica de ultrafiltración. En efecto, la ultrafiltración permite recuperar una parte de la fase acuosa de las nanoemulsiones en la que es posible entonces determinar el uranio libre por espectrometría de masa acoplada con un plasma inductivo (ICP-MS).

En primer lugar, los parámetros de ultrafiltración-ultracentrifugación, se han optimizado con el fin de obtener en el

filtrado sólo la fase acuosa de nanoemulsiones:

- porosidad del filtro: 3000 kDa
- volumen a centrifugar: 400 µl
- 5 - temperatura de centrifugación: 20°C
- velocidad de centrifugación: 6000 rpm
- duración de centrifugación: 30 minutos

10 Los filtrados límpidos así obtenidos se han analizado por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El análisis HPLC ha mostrado que los filtrados están constituidos únicamente por agua que indica así la ausencia de aceite, de tensioactivos y de calixareno.

15 Se ha llevado a cabo entonces un estudio que tiene como objetivo evaluar la retención del uranio por los filtros utilizados en ultrafiltración. Este estudio ha permitido concluir que el 47% como media del uranio depositado sobre el filtro en forma de nitrato de uranilo en tampón acetato pH = 5, es retenido en este último durante la ultrafiltración (figura 6). Esto se debe al hecho de que el filtro está constituido por celulosa regenerada, material que presenta unos sitios cargados electronegativamente con los cuales el uranio puede interactuar por uniones electroestáticas y así ser retenido [16]. Se ha verificado también mediante la realización de un balance de materia que el porcentaje correspondía claramente al uranio retenido en el filtro y no a un fenómeno de concentración del uranio en la fase depositada sobre el filtro (retentado) por la realización de un balance de materia (figura 7). En efecto, no hay aumento de la concentración en uranio en el retentado después de la ultrafiltración con respecto a la concentración inicialmente depositada.

25 Sabiendo que, utilizando la técnica de ultrafiltración, es posible recuperar unos filtrados de nanoemulsión constituidos únicamente por agua y que el uranio es retenido por el filtro de los sistemas de ultrafiltración a nivel del 47% como media, es por lo tanto posible evaluar *in vitro* el poder de descontaminación de las nanoemulsiones de calixareno.

30 Este ensayo de eficacia de descontaminación de las nanoemulsiones de calixareno se ha llevado a cabo según dos modos de contacto entre el contaminante y la nanoemulsión:

- o contacto dinámico: agitación con vuelco durante un tiempo determinado de un tubo que contiene la solución contaminante y la nanoemulsión de calixareno.
- 35 o contacto estático: puesta en contacto durante un tiempo determinado de la nanoemulsión de calixareno con la solución contaminante sin agitación.

40 Se ha podido realizar así una cinética de extracción del uranio por las nanoemulsiones de calixareno (para una relación $\frac{Q_{\text{calixareno}}}{Q_{\text{uranio}}}=10000$ y $\frac{V_{\text{contaminación}}}{V_{\text{formulación}}}=1$ (figura 8)).

45 Este estudio muestra que las nanoemulsiones no cargadas en calixareno extraen aproximadamente un 25% del uranio en modo estático y un 40% en modo dinámico. Esto se puede explicar por una captura del uranio por los tensioactivos no iónicos, ya que estos últimos presentan unos grupos etoxilo susceptibles de establecer unas uniones hidrógeno con los iones hidroxilos [17] y por lo tanto también aptos para retener uranio. El hecho de agitar la mezcla de nanoemulsión no cargada en calixareno y la solución contaminante permite favorecer el contacto entre el uranio y los tensioactivos, lo cual puede explicar que la extracción del uranio sea más importante en las condiciones dinámicas.

50 En lo que se refiere a las nanoemulsiones cargadas en calixareno a 2 mg/g, aproximadamente el 90% del uranio se extrae a partir de 35 minutos (es decir 5 minutos en tiempo real de experimentación) en dinámica frente a aproximadamente el 85% en modo estático. Estos resultados muestran por lo tanto que la presencia de calixareno en las nanoemulsiones mejora en por lo menos un factor 2 el rendimiento de extracción del uranio.

55 Además, un estudio de cinética realizado anteriormente con aceite de parafina cargada en calixareno como formulación galénica, ha mostrado que menos del 10% del uranio se extraía por esta formulación en modo estático, siendo las demás condiciones iguales $\frac{Q_{\text{calixareno}}}{Q_{\text{uranio}}}=10000$ y $\frac{V_{\text{contaminación}}}{V_{\text{formulación}}}=1$ (figura 9)).

60 Parece por lo tanto claramente que la formulación elegida (nanoemulsión de calixareno) es mucho más eficaz que el excipiente (aceite de parafina) cargado con calixareno. Esto se debe muy probablemente al hecho de que la superficie desarrollada entre el calixareno y el uranio en las nanoemulsiones es mucho mayor.

65 En conclusión, estos resultados muestran que la formulación elegida (nanoemulsión) y el principio activo utilizado, es decir el calixareno, contribuyen a la eficacia de la forma galénica. Las nanoemulsiones de calixareno son por lo tanto eficaces en descontaminación estática. Son por lo tanto unos sistemas muy adaptados a la descontaminación de heridas.

Ejemplo 4: Eficacia ex vivo de las nanoemulsiones de calixareno para la descontaminación

5 La eficacia de las nanoemulsiones de calixareno se ha evaluado utilizando un sistema de célula de Franz por el estudio de la cinética de paso transcutáneo del uranio con y sin aplicación de nanoemulsión (figura 10). Todos los estudios de difusión transdérmica se han llevado a cabo en unos explantes de piel de oreja de cerdo en condición oclusiva (n = 5). La contaminación se ha realizado por depósito de una solución de uranio empobrecido (^{238}U) en tampón acetato pH = 5.

10 Un primer experimento que tiene como objetivo determinar la cinética del paso transcutáneo del calixareno liberado desde 1 ml de nanoemulsión cargada a 4 mg/g ha mostrado que el calixareno así formulado no pasaba a través de la piel en un periodo de exposición de 24 horas (detección en HPLC a una longitud de onda $\lambda = 210 \text{ nm}$: límite de detección LD = $17 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$; límite de cuantificación LQ = $52 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

15 El estudio de eficacia de descontaminación de una nanoemulsión cargada en calixareno carboxílico a 4 mg/g (relación $Q_{\text{calixareno}}/Q_{\text{uranio}} = 10000$) ha permitido poner en evidencia una disminución del 98% de la cantidad de uranio que se ha difundido a través de la piel al cabo de 24 horas.

20 En efecto, el tratamiento de la contaminación por depósito de una nanoemulsión no cargada en calixareno permite ya una disminución del 71% de la cantidad de uranio difundido. Esto se debe por un lado a la dilución del uranio en la fase acuosa de la emulsión y por otro lado a un atrapado de un parte del uranio por los constituyentes de la nanoemulsión (demostrado en los ensayos *in vitro*). La adición de calixareno a la nanoemulsión permite también disminuir en 93% la cantidad de uranio difundido con respecto a la nanoemulsión no cargada (figura 11).

25 En conclusión, estos resultados confirman la eficacia de las nanoemulsiones de calixareno para la descontaminación de las pieles contaminadas por uranio, ya que permiten reducir la transferencia transcutánea de este actínido.

30 Referencias bibliográficas

[1] Le Guen B y Bérard P. Uranium et ses composés. En: Toxicologie-Pathologie professionnelle, Paris; Elsevier, 1998, Encyclopédie Médico Chirurgicale 16-008-10.

35 [2] Petitot F, Moreels AM y Paquet F. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. Can J Physiol Pharmacol 82(2):133-9 (2004).

[3] Tymen H, Gerasimo P y Hoffschir D. Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. Int J Radiat Biol 76(10):1417-24 (2000).

40 [4] Tymen H, Rateau G, Guillet K, Ramounet-Le Gall B, Gerasimo P y Fritsch P, Methods to measure transfer of radionuclides through intact or injured skin -Application to radiotoxicology [Méthodes de mesure du transfert cutané des actinides au travers d'un épiderme intact ou lésé, application à la radiotoxicologie]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 80(7):733-741 (2002).

45 [5] De Rey BM, Lanfranchi HE y Cabrini RL. Percutaneous absorption of uranium compounds. Environmental Research 30(2):480-491 (1983).

[6] Durbin PW, Kullgren B, Xu J y Raymond KN. Development of Decorporation Agents for the Actinides. Radiation Protection Dosimetry 79(1-4):433-443 (1998).

[7] Fukuda S, Lida H, Ikeda M, Yan X y Xie Y. Toxicity of uranium and the removal effects of CBMIDA and EHBP in simulated wounds of rats. Health Phys 89(1):81-8 (2005).

55 [8] Henge-Napoli MH, Ansoborlo E, Chazel V, Houpert P, Paquet F y Gourmelin P. Efficacy of ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP) for the decorporation of uranium after intramuscular contamination in rats. Int J Radiat Biol 75(11); 1473-7 (1999).

[9] Houpert P, Chazel V, Paquet F, Bailly T, Burgada R y Henge-Napoli MH Reduction of uranium transfer by local chelation in simulated wounds in rats. Hum Exp Toxicol 20(5);237-41 (2001).

[10] Houpert P, Chazel V y Paquet F, A local approach to reduce industrial uranium wound contamination in rats. Can J Physiol Pharmacol 82(2):73-8 (2004).

65 [11] Yang Z, Xu K, Wang L, Gu H, Wei H, Xang M y Xu B. Self-assembly of small molecules affords multifunctional supramolecular hydrogels for topically treating simulated uranium wounds. Chem Commun

35:4414-4416 (2005).

[12] Shan Z, Yang Y-Z, Tao Z, Jian H y Chang-Hong L. Uranium(VI) extraction by Winsor microemulsion Systems using trialkyl phosphine oxide. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 265(3):419-421 (2005).

5

[13] Guo J-x, Sun X, Du D-I, Wu X, Li M-x, Pang H, Sun S-x y Wang A-hi Uranium(VI) extraction from chloride solution with benzyloctadecyldimethyl ammonium chloride (BODMAC) in a liquid membrane process. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 275(2):365-369 (2008).

10

[14] Seiller M y Martini MC. *Formes pharmaceutiques pour application locale*. Lavoisier, 1996.

[15] Martini M-C, *Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie*. Lavoisier 2006, p. 411.

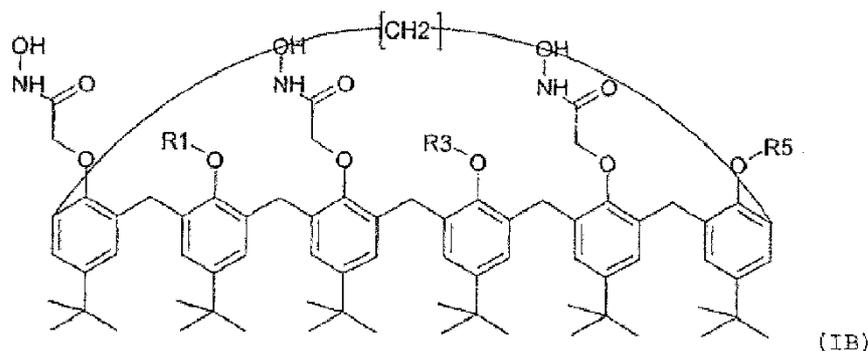
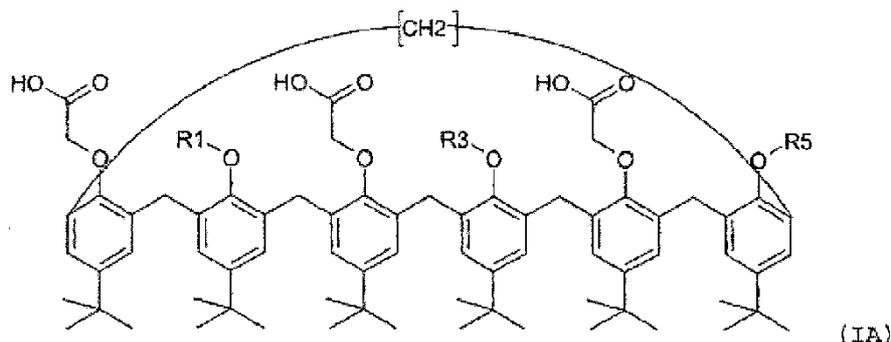
15

[16] Guo L, Warnken KW y Santschi PH. Retention behavior of dissolved uranium during ultrafiltration: Implications for colloidal U in surface waters. *Marine Chemistry* 107(2):156-166 (2007).

[17] Liu W, Sun D, Li C, Liu Q y Xu J. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *Journal of Colloid and Interface Science* 303(2): 557-563 (2006).

REIVINDICACIONES

1. Composición dermatológica o dermocosmética en forma de una nanoemulsión aceite en agua o agua en aceite que comprende uno o varios compuestos calixareno a título de principio activo y uno o varios excipientes farmacéutica, respectivamente, cosméticamente aceptables.
2. Composición dermatológica o dermocosmética según la reivindicación 1, en la que por lo menos uno de los compuestos calixareno es un calix[6]areno.
3. Composición dermatológica o dermocosmética según la reivindicación 1 o 2, en la que por lo menos uno de los compuestos calixareno presenta la fórmula (IA) o (IB)



en las que R1, R3 y R5, idénticos o diferentes, representan, cada uno independientemente:

- (i) un átomo de hidrógeno, o de halógeno,
- (ii) un radical acetilo, amino, fosfato, nitro, sulfato, carboxi, carboxílico, tiocarboxi, carbamato, tiocarbamato,
- (iii) un alquilo lineal o ramificado, que tiene 1 a 60, preferentemente 1 a 30 átomos de carbono, eventualmente sustituido, que presenta eventualmente por lo menos una insaturación etilénica o acetilénica,
- (iv) un cicloalquilo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono, eventualmente sustituido, que presenta eventualmente por lo menos una insaturación etilénica o acetilénica,
- (v) un arilo, un naftilo, un aril-(alquilo de C1-C30), un (alquilo de C1-C30)-arilo, eventualmente sustituidos, pudiendo los radicales (ii) a (v) estar sustituidos por unos átomos de halógeno, unos órgano-metálicos, unas funciones alcoholes, aminadas, ácidos o ésteres carboxílicos, sulfónicos, sulfúricos, fosfóricos, fosfónicos o hidroxámicos, carbamatos, tiocarbamatos, éteres, tioles, epóxidos, tioepóxidos, isocianatos, isotiocianatos o un carbono de estos radicales que puede estar sustituido por un heteroátomo de nitrógeno, azufre, fósforo, oxígeno, boro, arsénico;
- (vi) un polisacárido.

4. Composición dermocosmética según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende de 2 a 30 mg de calixareno por gramo de la composición.

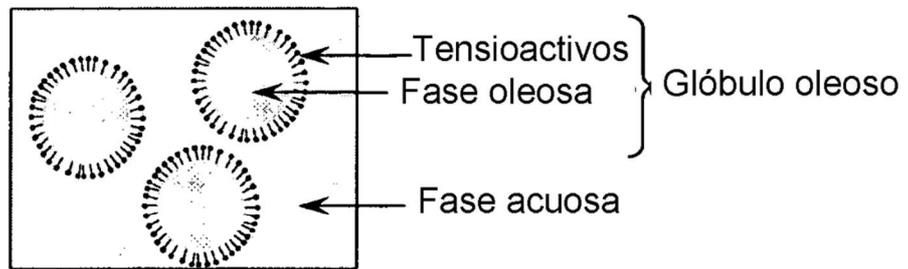


Figura 1

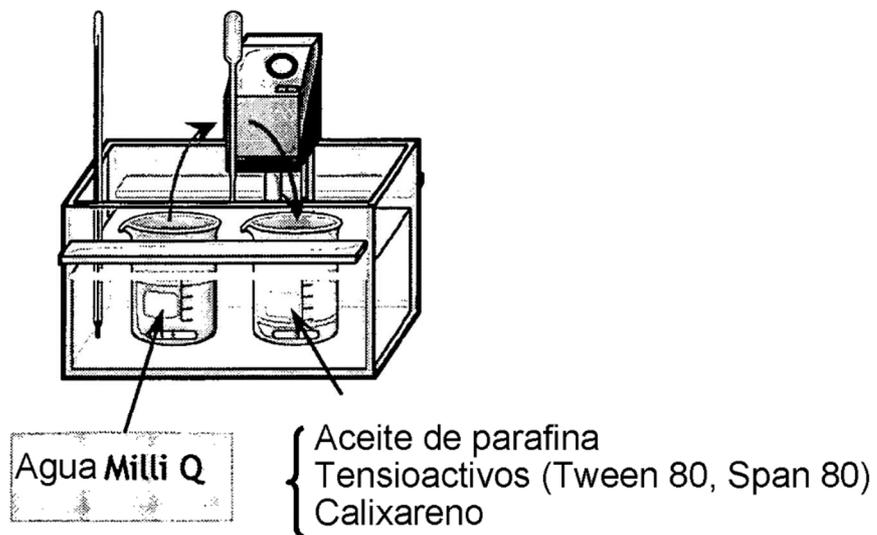


Figura 2

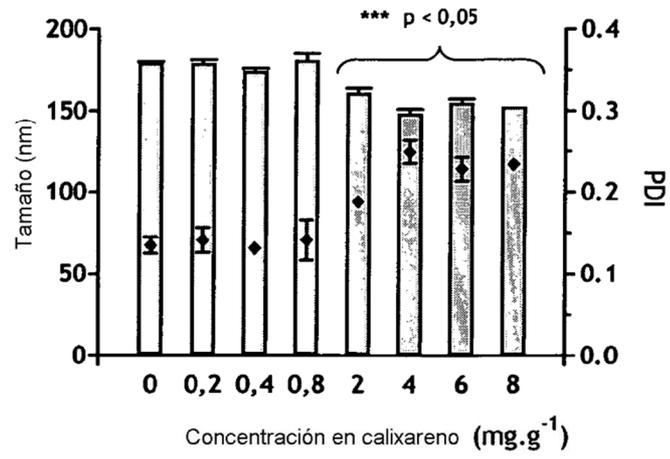


Figura 3

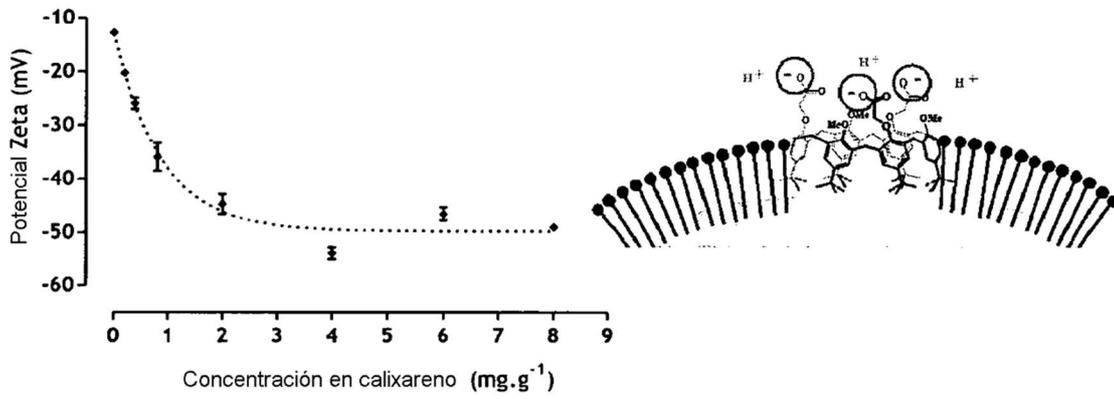


Figura 4

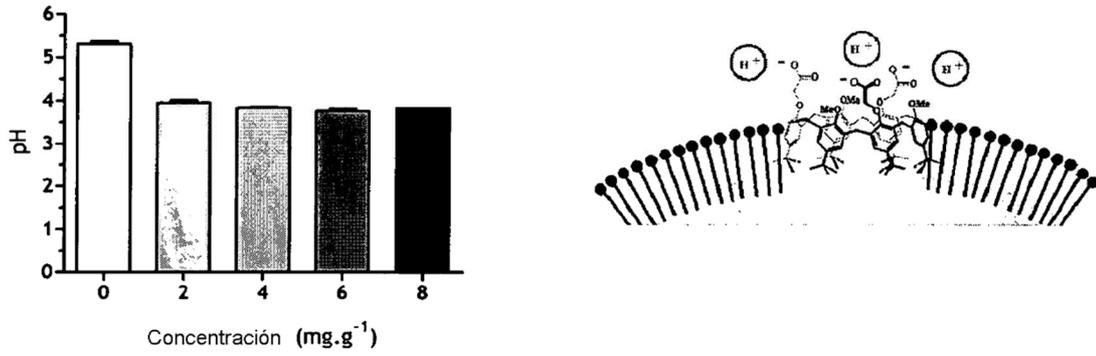


Figura 5

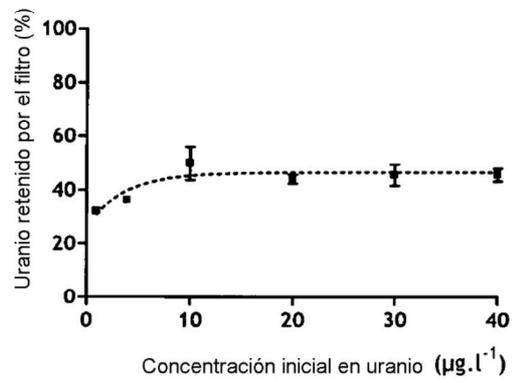


Figura 6

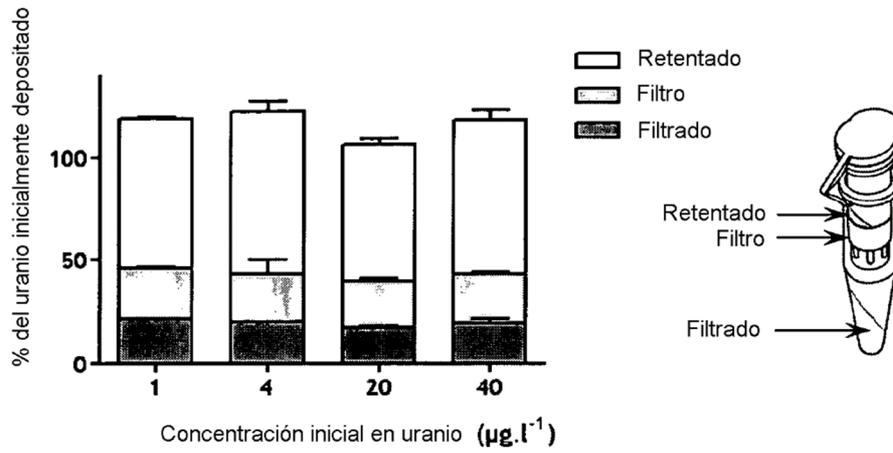


Figura 7

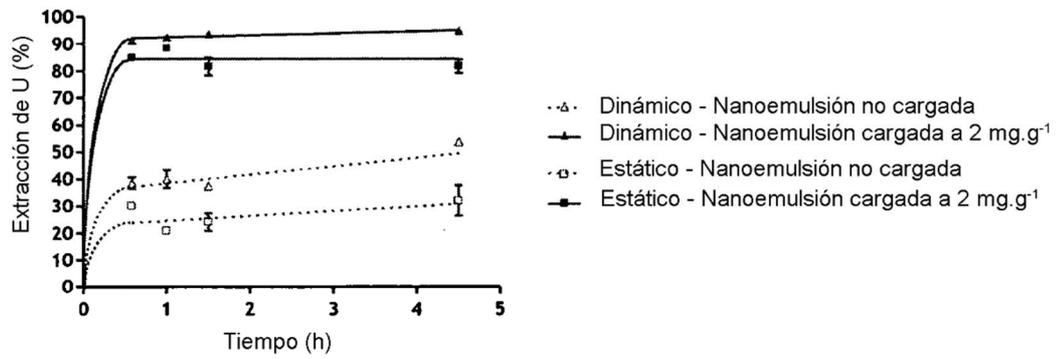


Figura 8

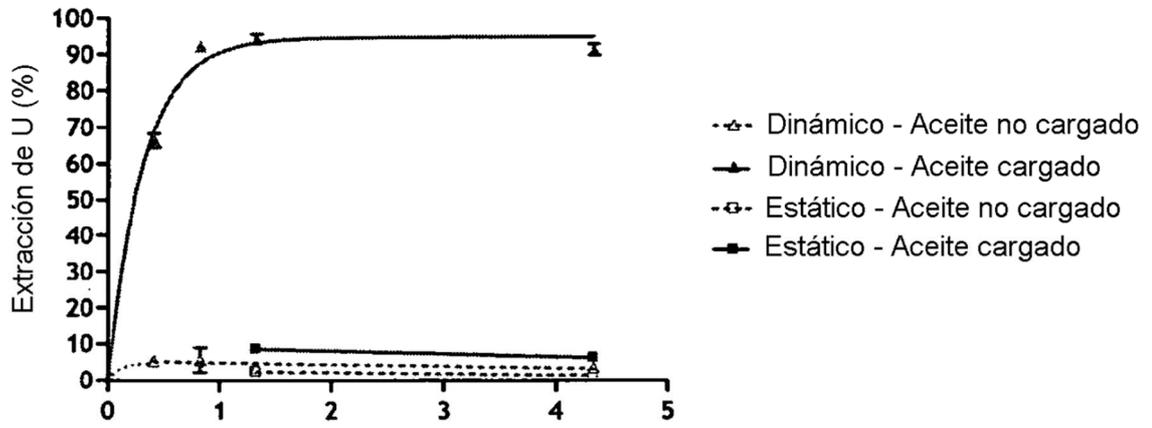


Figura 9

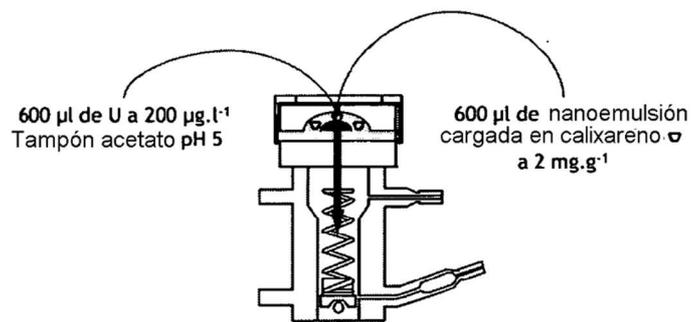
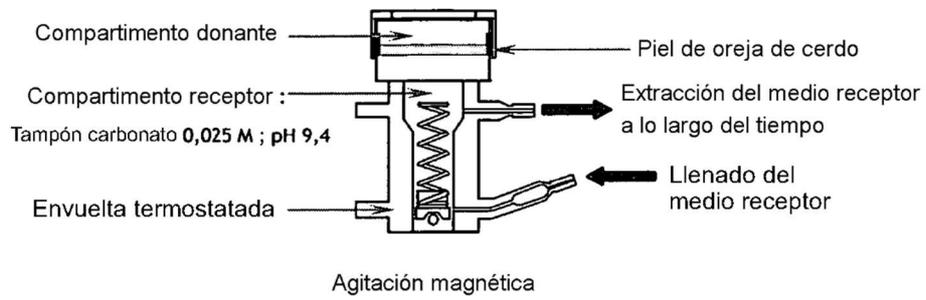


Figura 10

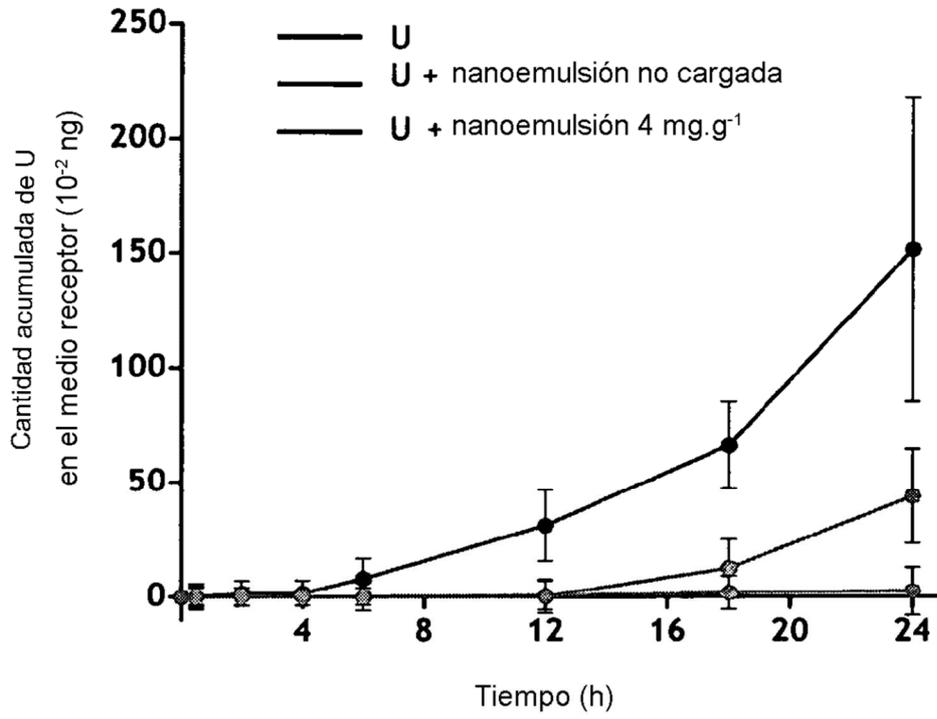


Figura 11