

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 846**

51 Int. Cl.:

C07D 307/62 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01)
A61K 8/37 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 8/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/IB2013/052031**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13136294**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13720075 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2825531**

54 Título: **Conjugados de vitamina C**

30 Prioridad:

16.03.2012 FR 1252382

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2019

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)
3 rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR y
UNIVERSITE PARIS-SUD (PARIS XI) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**COUVREUR, PATRICK;
ZOUHIRI, FATIMA;
GREF, RUXANDRA y
DESMAELE, DIDIER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 846 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

Conjugados de vitamina C

5 La presente invención pretende proponer un nuevo bioconjugado de la vitamina C particularmente interesante por su actividad con respecto a la piel. La presente invención se refiere también a procedimientos para su preparación, a composiciones que lo comprenden así como a su utilización en los campos cosmético, dermatológico, farmacéutico y alimentario.

La piel humana está constituida por dos compartimentos, a saber, un compartimento superficial, la epidermis, y un compartimento profundo, la dermis, que proporciona a la epidermis su soporte sólido.

10 Esta dermis, tejido nutritivo de la epidermis, está constituida principalmente por fibroblastos y una matriz extracelular compuesta principalmente por colágeno, elastina y una sustancia llamada sustancia fundamental, componentes sintetizados por el fibroblasto.

Los fibroblastos sintetizan predominantemente colágenos, glicoproteínas de matriz distintas de los colágenos (fibronectina, laminina), proteoglicanos y elastina. Los queratinocitos sintetizan predominantemente GAGs sulfatados y ácido hialurónico.

15 En lo que respecta a la matriz extracelular de la dermis, es como la de todos los tejidos conjuntivos del organismo, compuesta por proteínas que pertenecen a varias grandes familias: colágenos, glicoproteínas de matriz distintas de los colágenos (fibronectina, laminina), elastina y proteoglicanos (PGs). Se encuentran también glicosaminoglicanos (GAGs) en forma libre (es decir, no unidos a una proteína).

20 Los componentes de la matriz extracelular juegan en particular un papel importante en las propiedades mecánicas de la piel, en particular en su tonicidad, firmeza, elasticidad y flexibilidad.

El colágeno es una proteína compuesta por tres cadenas polipeptídicas alfa unidas por enlaces de hidrógeno entre la hidroxilisina y la hidroxiprolina y enlaces covalentes asociados. Según las diversas combinaciones posibles, existen varios tipos de colágeno con estructuras propias, que se encuentran en órganos particulares.

25 Entre estos tipos de colágeno, se pueden mencionar en particular el colágeno de tipo I y el colágeno de tipo III que se encuentran predominantemente dentro de la dermis. El colágeno de tipo I participa particularmente en la rigidez y en la resistencia de los tejidos. Durante el envejecimiento, es cada vez más predominante (más del 80%). Por tanto, las fibras se vuelven más rígidas y menos flexibles, causando una pérdida de firmeza de la piel.

En cuanto al colágeno de tipo III, también llamado "colágeno de juventud", se sintetiza en abundancia durante la vida fetal y la adolescencia.

30 Sin embargo, se ha encontrado que con la edad, la cantidad de colágeno de tipo III disminuye a favor del colágeno de tipo I (Wang *et al.*, African J. Biotechn., 2011, vol 10(13), 2524-2529).

Por otra parte, se sabe que la vitamina C, también conocida con el nombre de ácido ascórbico, 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona o también 3-ceto-L-gulofuranolactona, está implicada en centenares de procesos en el organismo.

35 También se sabe que la vitamina C tiene por función en particular ayudar al cuerpo a fabricar colágeno, que es esencial para la formación del tejido conjuntivo de la piel, de los ligamentos y huesos.

40 En general, un organismo se complementa con vitamina C por vía oral, tradicionalmente por medio de la alimentación y de manera más ocasional por medio de complementos alimentarios enriquecidos con vitamina C. Más recientemente, se ha propuesto administrar por vía tópica la vitamina C, en particular con el fin de mejorar el aspecto estético de la piel.

Desafortunadamente la vitamina C también es conocida por ser una de las vitaminas más frágiles. Por tanto, es sensible al calor, no resiste a los medios básicos y sobre todo es muy sensible al oxígeno del aire.

Por tanto, la mayoría de las formulaciones existentes que comprenden vitamina C deben generalmente contener agentes estabilizantes o conservantes con el fin de evitar cualquier degradación de la misma antes de su utilización.

45 Además, la vitamina C como tal tiene un bajo poder de penetración en la piel debido en particular a su naturaleza hidrófila.

50 Para compensar esta falta de permeabilidad del ácido ascórbico en la epidermis y la dermis de la piel, la solicitud internacional WO 2006/019186 propone utilizar, en productos sanitarios por vía tópica y productos alimenticios por vía oral, derivados liposolubles que comprenden vitamina C en forma copulada en su posición 6 con un ácido graso poliinsaturado (6-O-PUFA). Otros derivados de la vitamina C, como los ésteres de ácidos carboxílicos alifáticos de C₂-C₂₀ en posición 6 del ácido ascórbico tales como el palmitato de 6-ascorbilo y linolato de 6-ascorbilo, se

describen también en la patente de EE.UU. 4.997.958, pero con fines antioxidantes.

Sin embargo, y como se desprende de las pruebas que figuran más adelante, derivados tales como los descritos en los documentos WO 2006/019186 y US 4.997.958 no resultan totalmente satisfactorios en términos de penetración en las capas profundas de la piel.

- 5 El documento Couvreur et al. (*Couvreur et al., NANO LETTERS, ACS, US, vol. 6, no. 11, páginas 2544 - 2548*) divulga nanopartículas a base de ésteres del ácido escualénico como agente anticancerígeno o antiviral.

El documento Trommer et al. (*Trommer et al., Skin pharmacology and physiology : Journal of pharmacological and biophysical research, S. KARGER AG, BASEL, CH, vol 19, no.2, 9 de mayo de 2006, páginas 106-121*) divulga ésteres del ácido ascórbico con ácidos grasos como antioxidantes en productos alimenticios.

- 10 El documento Bekkara - Aounallah et al. (*Bekkara - Aounallah et al., Advanced functional materials, Wiley - VCH Verlag GMBH & Co. KGAA, DE, vol.18, no 22, 24 de noviembre de 2008, páginas 3715-3725*) divulga nanopartículas a base de ésteres del ácido escualénico como agente anticancerígeno.

La solicitud de patente EP0296483 divulga un procedimiento para la preparación de ésteres en la posición 6 del ácido ascórbico.

- 15 La solicitud de patente JP2012001457 divulga un agente antiarrugas que comprende un éster del ácido L-ascórbico 2-fosfato.

Además, estos derivados ya conocidos no son totalmente satisfactorios en términos de citotoxicidad y algunos de ellos no siempre se prestan a una formulación de concentración elevada. Por ejemplo, el compuesto palmitato de 6-ascorbilo formulado en un aceite ya no está presente por encima del 5% en peso, expresado en peso de vitamina C activa con respecto al peso total de la composición, en forma de una formulación homogénea y tiene tendencia a cristalizar. Estos inconvenientes hacen que este compuesto sea particularmente poco eficaz en una formulación oleosa que es, por razones obvias, una fórmula galénica particularmente apreciada para una administración por vía tópica.

- 20 La presente invención tiene específicamente por objetivo proponer nuevos derivados de la vitamina C que den satisfacción en estos términos.

Por tanto, según uno de sus aspectos, la presente invención pretende proporcionar nuevos derivados de vitamina C que penetren más fácilmente en la piel y que permitan mejorar el efecto beneficioso de la vitamina C en las capas profundas de la piel.

- 25 Según otro de sus aspectos, la presente invención pretende proponer nuevos derivados de vitamina C capaces de presentar una mayor estabilidad con respecto a la oxidación.

Según otro más de sus aspectos, la presente invención pretende proponer nuevos derivados de vitamina C capaces de estimular la expresión del colágeno, y más particularmente del colágeno III.

Según otro más de sus aspectos, la presente invención pretende proporcionar nuevos derivados de vitamina C capaces de estimular la expresión de los GAGs.

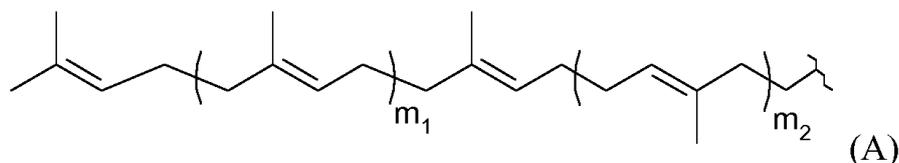
- 30 Según otro más de sus aspectos, la presente invención pretende proponer nuevos derivados de vitamina C, propicios para una formulación tanto en un medio acuoso como en un medio oleoso, adecuados para formularse de manera homogénea, e incluso para cantidades importantes en equivalentes de vitamina C.

Según otro más de sus aspectos, la presente invención pretende proponer nuevos derivados de vitamina C compatibles con cualquier modo de administración y que proporcionen satisfacción en términos de inocuidad.

- 35 Finalmente según otro de sus aspectos, la presente invención pretende proporcionar nuevos derivados de vitamina C capaces de mejorar la morfología general de la piel en términos de flexibilidad, hidratación, espesor, y elasticidad.

Inesperadamente, los inventores de la presente invención han encontrado que la copulación covalente del ácido ascórbico con al menos una molécula específica permite con exactitud dar satisfacción en estos términos.

- 40 Por tanto, un objetivo de la presente invención se refiere a un conjugado formado por al menos una molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona o derivado unido covalentemente a al menos un radical hidrocarbonado de la fórmula (A) siguiente:



en la que:

- $m_1 = 0, 1, 2, 3, 4, 5 \text{ ó } 6$;
- $m_2 = 0, 1, 2, 3, 4, 5 \text{ ó } 6$; y

5 -

representa el enlace a la molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona o derivado que tiene un sistema 3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona como se esquematiza de la siguiente manera:



10 En el sentido de la invención, el término complejo o conjugado se usará de manera intercambiable para indicar el producto de copulación entre al menos una molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona o derivado y al menos un radical hidrocarbonado de fórmula (A).

15 En el sentido de la invención, el término "enlace" asociado al símbolo significa que es el sitio de enlace de la entidad de fórmula (A) a la entidad de ácido ascórbico o derivado. Por tanto, como se detalla más adelante, el sitio de enlace puede estar involucrado directamente en un solo enlace covalente entre la entidad (A) y la entidad de ácido ascórbico o derivado, o puede estar representado por una función resultante de la interacción entre dos funciones reactivas, por ejemplo entre una función carboxílica y una función alcohol, o también estar representado por un grupo de tipo espaciador.

20 Por tanto, la entidad (A) y la entidad ácido ascórbico o derivado pueden enlazarse una a la otra mediante un enlace covalente o mediante un grupo espaciador o una función de tipo éster, éter, fosfato o amida, como se explica más adelante.

Según otro objetivo, la invención se refiere a un conjugado como se ha definido anteriormente, en el que el compuesto o radical hidrocarbonado comprende de 12 a 40 átomos de carbono, preferiblemente 18 a 30 átomos de carbono.

25 Como se explica con más detalle más adelante, dicho compuesto o radical hidrocarbonado puede convenientemente derivarse del escualeno, farnesol o geraniol y más preferiblemente del escualeno.

Convenientemente, los dos tipos de entidades que forman el complejo definido anteriormente están copuladas por un enlace covalente de tipo éster, éter, fosfato o amida, y preferiblemente éster.

30 La presente invención tiene también por objetivo una formulación oleosa que comprende un conjugado tal como se ha descrito anteriormente. Más particularmente, esta formulación se presenta en forma de un gel que puede contener hasta al menos 3% en peso, incluso al menos 10% en peso, expresado en peso de vitamina C activa, con respecto al peso total de la composición.

Según una variante preferida, el aceite considerado para formular el conjugado según la invención en el estado de dicho gel es el escualeno o uno de sus derivados.

35 Según otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a nanopartículas de un conjugado tal como se ha descrito anteriormente.

En efecto, inesperadamente, los inventores han encontrado que el conjugado según la invención es capaz de autoensamblarse, es decir, autoorganizarse espontáneamente en medio acuoso en forma de nanopartículas que poseen al menos las mismas actividades que el propio conjugado.

40 Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento para la preparación de dichas nanopartículas, que comprende al menos la dispersión de un conjugado según la presente invención en al menos un disolvente orgánico, a una concentración suficiente para obtener, durante la adición de la mezcla correspondiente a una fase acuosa con agitación, la formación instantánea de nanopartículas en suspensión en dicha fase acuosa, y, cuando

sea necesario, el aislamiento de dichas partículas.

La capacidad de los conjugados según la invención para organizarse en forma de nanopartículas según la presente invención, constituye una alternativa ventajosa por varios motivos.

5 Primero, el estado de nanopartículas del conjugado de la vitamina C según la invención permite convenientemente formular ésta para ser homogénea de manera estable en medio acuoso.

Además, como se desprende de las pruebas que se exponen más adelante, el estado de nanopartículas del conjugado de la vitamina C según la invención permite amplificar la penetración de ésta hasta las capas profundas de la piel. Esta mejora de la penetración en las capas profundas de la piel permite convenientemente utilizar concentraciones menores de vitamina C que las que se requieren habitualmente.

10 Además, las nanopartículas según la invención permiten convenientemente estimular la expresión del colágeno y más específicamente del colágeno III, así como de los GAGs, como se ha indicado anteriormente, y mejorar la morfología general de la piel.

Además, dado el pequeño tamaño de las partículas de conjugados considerados según la invención, esta forma particular es administrable en forma de una suspensión acuosa por vía parenteral (o inyectable) y en particular por vía intravenosa.

15 Por tanto, convenientemente, el tamaño medio de estas nanopartículas varía de 30 nm a 500 nm, en particular de 40 a 250 nm, incluso de 45 a 95 nm.

20 Nanopartículas de conjugados formados por copulación de al menos un radical hidrocarbonado y, en particular el escualeno, con un agente activo tal como gemcitabina, nucleósidos, ácidos nucleicos, estatinas, taxoides, doxorubicina, epirubicina y beta-lactamina se han descrito ya en los documentos WO 2006/090029, Couvreur *et al.*, Nano Lett. 2006, 6, pp. 2544-25 48, WO 2009/150344, WO 2009/071850, WO 2010/049899 y WO2010/049900.

Sin embargo, estos agentes activos son con claridad estructuralmente muy diferentes a la vitamina C.

25 La presente invención tiene también por objetivo una composición cosmética, dermatológica o alimentaria que comprende, como materia activa, al menos un conjugado según la invención y/o nanopartículas según la invención, en asociación con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable.

Según otro objetivo, la invención se refiere al uso cosmético de un conjugado según la invención y/o de nanopartículas según la invención para la prevención y/o tratamiento de los signos de envejecimiento de la piel del cuerpo y/o de la cara.

30 Por ejemplo, una composición cosmética según la invención puede usarse para la prevención y/o tratamiento de las arrugas y/o pequeñas arrugas, piel envejecida, falta de elasticidad y/o tono de la piel, adelgazamiento de la dermis, degradación de las fibras de colágeno, piel blanda, piel adelgazada y/o degradaciones internas de la piel como resultado de la exposición a las radiaciones ultravioleta.

35 Según otro objetivo, la presente invención pretende proteger el uso cosmético de un conjugado según la invención y/o de nanopartículas según la invención para estimular la síntesis de colágeno, en particular del colágeno III y/o estimular la síntesis de glicosaminoglicanos.

La presente invención se refiere también a un conjugado según la invención y/o a nanopartículas según la invención para su utilización en medicina y más específicamente en la prevención y/o tratamiento de quemaduras y/o heridas y/o de cualquier otra patología relacionada con la cicatrización de la dermis y/o epidermis.

40 También según otro objetivo, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético de la piel del cuerpo y/o de la cara y/o del cuero cabelludo, en el que se administra una composición tal como se ha definido anteriormente.

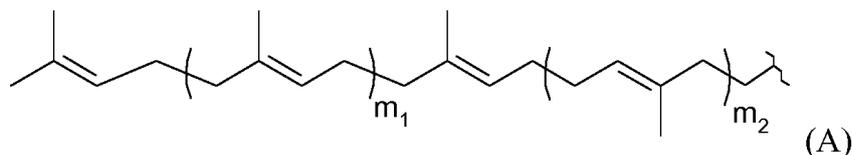
Complejo según la invención

Como se ha especificado anteriormente, los conjugados según la invención se forman por copulación de una molécula de vitamina C o análogo con al menos un radical específico hidrocarbonado.

45

Radical hidrocarbonado

En el sentido de la presente invención, el radical hidrocarbonado corresponde a la fórmula (A) siguiente:



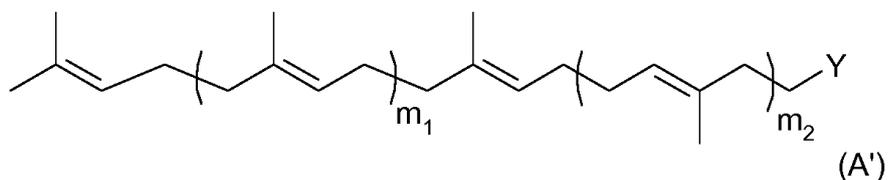
en la que:

- 5
- $m_1 = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ ó 6 ;
 - $m_2 = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ ó 6 ; y
 -

representa el sitio de enlace a la molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona o derivado que tiene un sistema 3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona como se esquematiza de la siguiente manera:



- 10
- Este radical hidrocarbonado se deriva generalmente de la presencia de al menos una molécula de compuesto de fórmula (A'):



en la que:

- 15
- Y representa una función reactiva y en particular de tipo alcohol, ácido carboxílico, o fosfato; y m_1 y m_2 son como se han definido para el radical de fórmula (A).

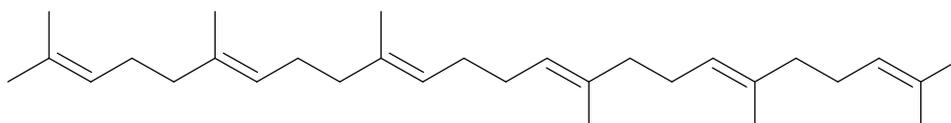
El compuesto hidrocarbonado de fórmula (A') comprende al menos 12 átomos de carbono, en particular 12 a 40 átomos de carbono y preferiblemente 18 a 30 átomos de carbono.

Convenientemente, los compuestos de fórmula (A') se seleccionan de los compuestos de fórmula (A') en los que:

- 20
- m_1 representa 1, m_2 representa 2 e Y es una función $-\text{COOH}$,
 - m_1 y m_2 representan 0 e Y es una función $-\text{COOH}$, y
 - m_1 representa 1, m_2 representa 0 e Y es una función $-\text{COOH}$.

Más específicamente, un compuesto de fórmula (A) útil para la formación de un conjugado según la presente invención es el escualeno (también llamado espiraceno o sirpreno), que es un producto intermedio esencial de la biosíntesis del colesterol.

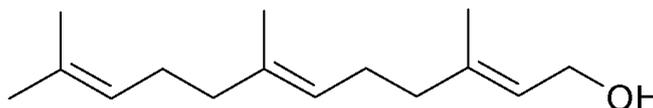
Químicamente, se llama también (E) 2, 6, 10, 15, 19, 23-hexametil-2, 6, 10, 14, 18, 22-tetracosahexeno) de la siguiente fórmula:



En este modo de realización preferido de la invención, el radical hidrocarbonado presente en un conjugado según la presente invención es un radical de fórmula (A) en la que $m_1 = 1$ y $m_2 = 2$.

Otro compuesto útil para la formación de un complejo según la presente invención es el farnesol, que es un alcohol sesquiterpénico acíclico.

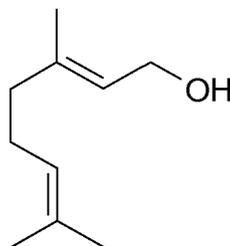
- 5 Químicamente, se llama también (2E, 6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-ol de la siguiente fórmula:



En este otro modo de realización de la invención, el radical hidrocarbonado presente en un complejo según la presente invención es un radical de fórmula (A) en la que $m_1 = 1$ y $m_2 = 0$.

- 10 Aún otro compuesto útil para la formación de un conjugado según la presente invención es el geraniol (también llamado rodinol), que es un alcohol terpénico insaturado.

Químicamente, también se llama (2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol de la siguiente fórmula:



En este otro modo de realización de la invención, el radical hidrocarbonado presente en un complejo según la presente invención es un radical de fórmula (A) en la que $m_1 = 0$ y $m_2 = 0$.

- 15 Según un modo de realización preferido de la presente invención, el derivado hidrocarbonado presente en un complejo según la presente invención es un derivado escualénico.

A modo de ilustración de los compuestos hidrocarbonados capaces de formar un complejo que contiene al menos un derivado escualénico según la presente invención, se pueden mencionar más particularmente el ácido escualénico y sus derivados tales como el ácido 1,1',2-tris-noresqualénico, 1,1',2-tris-noresqualenamina, 1,1',2-tris-noresqualenol, 1,1',2-tris-noresqualetiol, ácido escualenacético, escualeniletanol, escualeniletanotiol, escualeniletilamina.

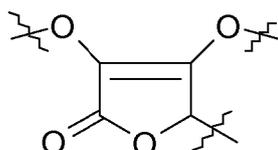
En particular, un conjugado según la presente invención podrá contener al menos un radical que se deriva de la copulación covalente de una molécula de ácido 1,1',2-tris-noresqualénico.

En particular, un conjugado según la presente invención podrá contener al menos un radical que se deriva de la copulación covalente de una molécula de 1,1',2-tris-noresqualenol.

- 25 Alternativamente, un conjugado según la presente invención puede comprender al menos dos radicales hidrocarbonados de acuerdo con la presente invención.

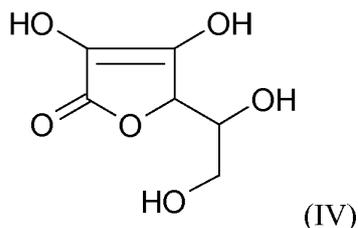
Vitamina C

Estructuralmente, la vitamina C y sus derivados en el sentido de la invención tienen en común un sistema 3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona que se puede esquematizar mediante el motivo siguiente:



- 30 En consecuencia, los conjugados según la invención poseen convenientemente dicho motivo.

Más específicamente, la vitamina C está representada por la fórmula (IV) y su forma tautómera de la siguiente manera.



Los compuestos de fórmula general (IV) pueden comprender uno o varios carbonos asimétricos. Por tanto pueden existir en forma de enantiómeros o de diastereoisómeros. Estos enantiómeros, diastereoisómeros, así como sus mezclas, incluidas las mezclas racémicas, forman parte de la invención.

- 5 Los compuestos de las fórmulas mencionadas anteriormente pueden existir en forma de ácidos o de sales de adición con bases.

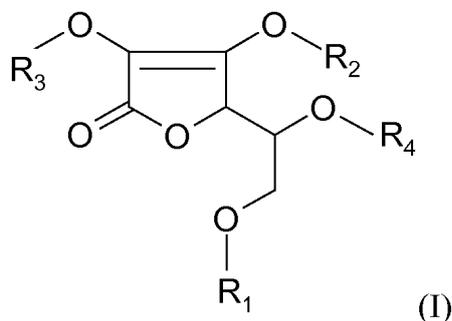
Estas sales se preparan convenientemente con bases farmacéuticamente aceptables, pero las sales de otras bases útiles, por ejemplo, para la purificación o la separación de los compuestos de las fórmulas mencionadas anteriormente forman parte también de la invención.

- 10 Los compuestos de fórmula general (IV) pueden, además, estar en forma de hidratos o de solvatos, a saber, en forma de asociaciones o de combinaciones con una o varias moléculas de agua o con un disolvente. Tales hidratos y solvatos forman parte también de la invención.

Convenientemente, según la presente invención, se puede complejar ácido ascórbico, ascorbato sódico, ascorbato potásico y/o ascorbato cálcico, y preferiblemente ácido ascórbico.

- 15 Complejo de vitamina C/radical hidrocarbonado

Según un modo de realización particular, el conjugado de acuerdo con la invención es de la fórmula general (I)

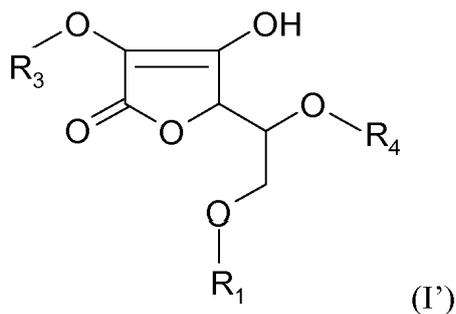


en la que:

- 20 R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , idénticos o diferentes, representan independientemente uno de otro un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado de fórmula (A) como se ha definido anteriormente,

siendo al menos uno de los grupos R_1 , R_2 , R_3 y R_4 diferentes del átomo de hidrógeno.

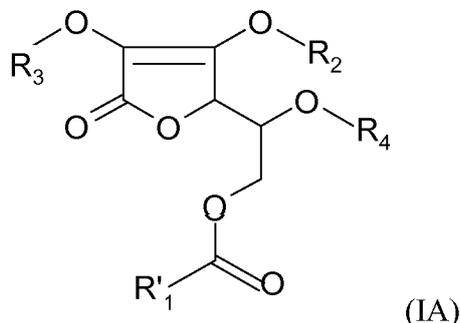
Los derivados de fórmula (I) según la invención en los que R_2 es un átomo de hidrógeno se ilustran mediante la fórmula general (I') siguiente:



- 25 en la que R_1 , R_3 y R_4 son como se han definido anteriormente, siendo al menos uno de los grupos R_1 , R_3 y R_4

diferentes del átomo de hidrógeno.

Según otro modo de realización particular, el conjugado de acuerdo con la invención es de la fórmula general (IA)



en la que:

- 5 R_2 , R_3 y R_4 son como se han definido anteriormente y R'_1 representa un radical hidrocarbonado de fórmula (A) como se ha definido anteriormente.

Convenientemente, el conjugado según la invención es de la fórmula general (IA) en la que R_2 , R_3 y R_4 representan los tres un átomo de hidrógeno.

- 10 Los radicales hidrocarbonados según la invención están generalmente unidos por un enlace covalente a nivel del grupo hidroxilo situado en el átomo de carbono 2 y/o 3 y/o 4 y/o 5 y/o 6 del ácido ascórbico, preferiblemente a nivel del grupo hidroxilo situado en el átomo de carbono 6 del ácido ascórbico, o a nivel del grupo hidroxilo situado en el átomo de carbono 2 del ácido ascórbico, o a nivel del grupo hidroxilo situado en el átomo de carbono 3 del ácido ascórbico.

- 15 Por supuesto los complejos de ácido ascórbico según la presente invención pueden ser complejos que comprenden dos derivatizaciones, tres derivatizaciones, incluso cuatro derivatizaciones, pudiendo éstas ser idénticas o diferentes.

- 20 Como se ha especificado anteriormente, la formación del complejo de vitamina C/radical hidrocarbonado según la invención requiere que las dos entidades reunidas lleven respectivamente una función llamada reactiva, es decir, capaz de formar a través de su interacción el enlace covalente esperado. Estas funciones pueden o no estar naturalmente presentes en las dos entidades de partida. En caso negativo, la entidad de partida deberá sufrir una modificación previa a la reacción de copulación.

Más específicamente, el compuesto hidrocarbonado según la invención es generalmente portador de una función susceptible de reaccionar con una función presente en la molécula de vitamina C considerada, para establecer un enlace covalente entre las dos entidades, por ejemplo de tipo éster, éter, fosfato o amida, formando así un complejo covalente.

- 25 Convenientemente, se trata de una función éster. Por ejemplo, el compuesto hidrocarbonado capaz de reaccionar con una molécula de vitamina C o uno de sus derivados para formar el complejo mencionado anteriormente es el ácido 1,1',2-tris-noresqualénico o uno de sus derivados como, por ejemplo, su haluro de ácido y más particularmente el cloruro de ácido, o su anhídrido mixto con cloroforniato de etilo. Preferiblemente, se utiliza el cloruro de ácido derivado del ácido 1,1',2-tris-noresqualénico.

- 30 Según otra variante, se trata de una función éter. Por ejemplo, el compuesto hidrocarbonado capaz de reaccionar con una molécula de vitamina C o uno de sus derivados para formar el conjugado mencionado anteriormente, es 1,1',2-tris-noresqualenol o uno de sus derivados, como por ejemplo mesilato de 1,1',2-tris-noresqualenol.

- 35 Según otra variante de realización, la unión covalente existente entre los dos tipos de moléculas se puede representar mediante un espaciador funcional o incluso un brazo enlazador. Dicho brazo puede en particular resultar útil para aumentar la fuerza de interacción de la vitamina C/radical hidrocarbonado.

Dicho brazo puede también ser conveniente para introducir a través de cada uno de los dos extremos de su esqueleto las funciones adecuadas, es decir, que poseen respectivamente la afinidad de reacción esperada, una para la función presente en el compuesto de estructura hidrocarbonada según la invención, y la otra para la función presente en la molécula de vitamina C considerada.

- 40 También se puede considerar que este brazo enlazador tenga además en su esqueleto una función lábil, adecuada posteriormente para la separación del compuesto de estructura hidrocarbonada, de la molécula de vitamina C considerada. Puede, por ejemplo, tratarse de un motivo peptídico reconocible por una enzima.

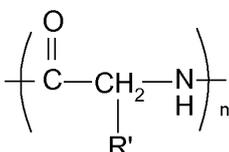
Los motivos de tipo brazo enlazador son bien conocidos por los expertos en la técnica y su implementación está

claramente dentro de sus competencias.

Como representante de los brazos enlazadores que pueden contemplarse según la invención, se pueden mencionar en particular las cadenas de alquileo, motivos (poli)aminoácidos, polioles, sacarídicos, y poli(etilenglicol) (polieteróxidos).

5 En el sentido de la presente invención, se entiende por:

- "cadenas de alquileo", un grupo alquileo(C₁-C₄), es decir, un grupo alquilo divalente que puede comprender de 1 a 4 átomos de carbono. A modo de ejemplo se pueden mencionar metileno, propileno, isopropileno, butileno.
- "motivo sacarídico", un radical que comprende al menos un radical seleccionado de triosas (gliceraldehído, dihidroxiacetona), tetrasas (eritrosa, treosa, eritrolosa), pentosas (arabinosa, lixosa, ribosa, desoxirribosa, xilosa, ribulosa, xilulosa), hexosas (alosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, manosa, talosa, fructosa, psicosa, sorbosa, tagatosa), heptosas (manoheptulosa, sedoheptulosa), octosa (octolosa, 2-ceto-3-desoxi-mano-octonato), isonosas (sialosa), y
- "motivo (poli)aminoácido", un motivo que tiene al menos una unidad:



15 en la que n es superior o igual a 1 y R' representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆), eventualmente sustituido con uno o varios hidroxilos, un alcoxilo(C₁-C₆).

20 Así, en el sentido de la presente invención, una "unión covalente" representa preferiblemente un enlace covalente, en particular como se ha especificado anteriormente, pero también cubre una unión covalente representada por un brazo enlazador como se ha definido anteriormente.

La reacción de copulación necesaria para el establecimiento de al menos un enlace covalente entre al menos una molécula de vitamina C considerada y al menos un radical hidrocarbonado de acuerdo con la presente invención, se puede llevar a cabo según las condiciones estándar y, por tanto, su realización está claramente dentro de los conocimientos del experto en la técnica.

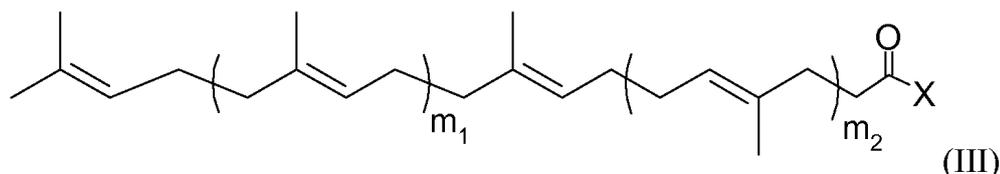
25 Esta reacción generalmente se realiza en disolución en presencia y en exceso de al menos un compuesto hidrocarbonado considerado según la presente invención con respecto a la molécula de vitamina C utilizada según la invención, por ejemplo a razón de dos equivalentes, según las condiciones estándar requeridas para hacer interaccionar las dos funciones específicas que llevan cada una de las dos entidades.

30 Preferiblemente, un compuesto hidrocarbonado de partida para la síntesis de un complejo según la invención es un derivado escualénico en forma ácida, tal como, por ejemplo, el ácido 1,1',2-tris-norescualénico, que se puede preparar según el procedimiento descrito en el ejemplo 1a.

Después, la copulación covalente de las dos entidades del complejo de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo, en particular, como sigue.

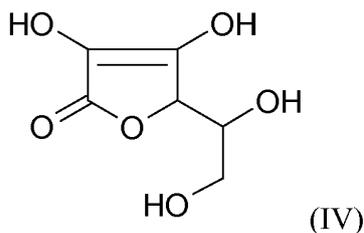
35 Según otro objetivo, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación (en lo sucesivo denominado primera ruta) del complejo según la invención, que comprende:

la condensación de al menos una molécula de un haluro de acilo de fórmula (III)



en la que X es un átomo de halógeno y preferiblemente un átomo de cloro, y m₁ y m₂ son como se han definido anteriormente en el compuesto de fórmula (A),

40 y de al menos una molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona de fórmula (IV)

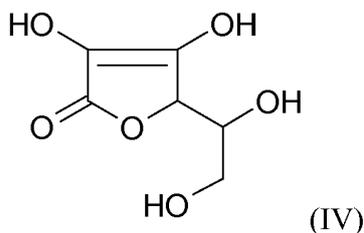


para obtener dicho complejo o conjugado según la invención.

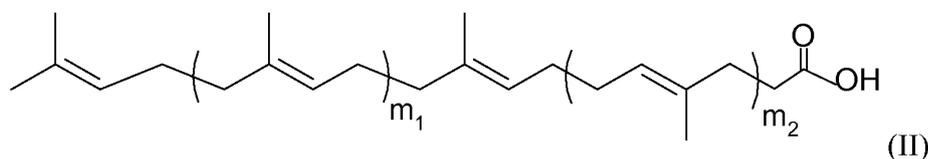
5 La preparación del haluro de acilo de fórmula (III) a partir del ácido carboxílico correspondiente y de un agente halogenante tal como cloruro de tionilo SOCl_2 , tricloruro de fósforo PCl_3 , pentacloruro de fósforo PCl_5 y cloruro de oxalilo, está claramente dentro de los conocimientos generales del experto en la técnica.

La primera ruta de preparación del conjugado según la invención permite obtener cantidades de dicho complejo con un rendimiento de al menos 30%, incluso de al menos 34%, y con un grado de pureza de aproximadamente 90%.

10 Según otro objetivo, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación (en lo sucesivo denominado segunda ruta) del conjugado según la invención que comprende la reacción de esterificación entre al menos una molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona de fórmula (IV)



y al menos una molécula de un ácido de fórmula (II)



en la que m_1 y m_2 son como se han definido anteriormente para el compuesto de fórmula (A).

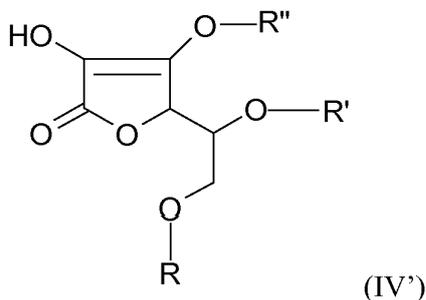
15 Convenientemente, dicha reacción de esterificación se realiza en presencia de una lipasa como catalizador.

20 Las lipasas o triacilglicerol acil-hidrolasas son enzimas atípicas por su mecanismo de acción y su especificidad de sustrato (Fickers *et al.* Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2008, 12(2), 119-130 o Alloue *et al.*, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2008, 12(1), 57-68). Son catalizadores muy utilizados en síntesis orgánica, principalmente debido a su estabilidad y su actividad en medio disolvente. Entre las lipasas de acuerdo con la invención, se pueden mencionar en particular lipasas vegetales, lipasas de mamíferos y lipasas microbianas. Según la invención, se preferirá utilizar una lipasa microbiana, incluso más preferiblemente una lipasa seleccionada de *C. cylindracea*, *C. antarctica*, *C. miehei* y sus mezclas, y de manera aún más preferida una lipasa *C. antarctica* tal como la comercializada por la sociedad Novozyme Corp bajo el nombre comercial Novozyme 435®

25 La segunda ruta de preparación del conjugado según la invención conduce a la obtención de cantidades de dicho complejo con un rendimiento inferior o igual a 30% y con un grado de pureza superior o igual a 95%.

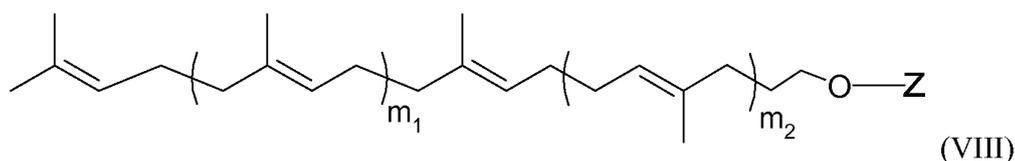
Según otro objetivo, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación del conjugado según la invención, que comprende:

la reacción entre al menos una molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona de fórmula (IV')



en la que R, R' y R'' representan un átomo de hidrógeno o un grupo protector;

y al menos una molécula de un compuesto de fórmula (VIII)

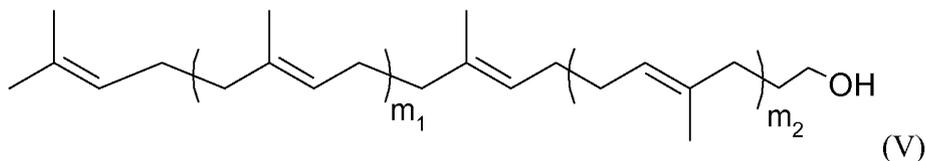


5 en la que m_1 y m_2 son como se han definido anteriormente para el compuesto de fórmula (A); y Z es un átomo de hidrógeno o un grupo $-\text{SO}_2-\text{CH}_3$.

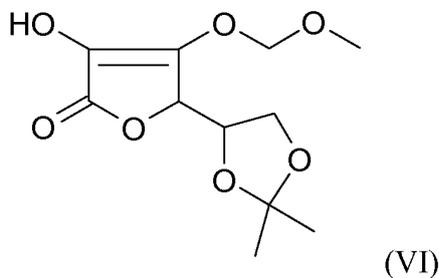
Según un modo de realización preferido, el compuesto hidrocarbonado de partida para la síntesis del conjugado según la invención es 1,1',2-trisnorescualenol como se ilustra en particular en el ejemplo 1b.

10 Después, la copulación covalente de las dos entidades del conjugado de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en particular de la siguiente manera.

Un procedimiento para la preparación del conjugado según la invención que comprende la reacción de al menos una molécula de alcohol de fórmula (V)



15 en la que m_1 y m_2 son como se han definido anteriormente,
con al menos una molécula derivada del ácido ascórbico de fórmula (VI)



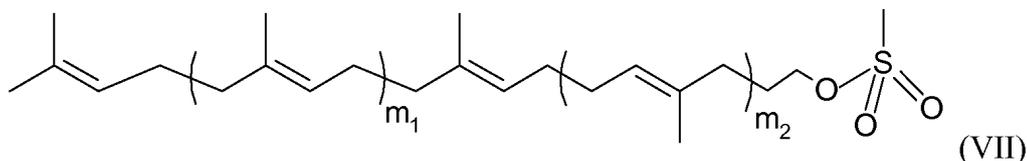
seguida por una hidrólisis para obtener dicho conjugado según la invención, también se describe.

20 Según otro modo más de realización preferido, el compuesto hidrocarbonado de partida para la síntesis del conjugado según la invención es mesilato de 1,1',2-trisnorescualenol como se ilustra en particular en el ejemplo 1c.

Después, la copulación covalente de las dos entidades del conjugado de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo en particular como sigue.

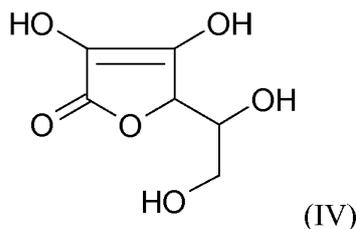
Un procedimiento para la preparación del conjugado según la invención que comprende la reacción de al menos una

molécula de mesilato de alcohol de fórmula (VII)



en la que m_1 y m_2 son como se han definido anteriormente,

con al menos una molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona de fórmula (IV)



5

para obtener dicho conjugado según la invención, también se describe.

Gel según la invención

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención tiene también por objetivo un conjugado según la invención formulado en estado de gel con al menos un aceite.

10 Entre los aceites que son adecuados para la presente invención, se puede mencionar más particularmente el escualeno. Sin embargo, se pueden utilizar otros aceites en la medida en que sean compatibles con las aplicaciones previstas y el complejo según la invención.

15 Un gel formado a partir de escualeno y de un complejo o conjugado según la invención permite en particular obtener formulaciones homogéneas que pueden comprender hasta al menos 3% en peso, incluso al menos 10% en peso, expresado en peso de vitamina C activa con respecto al peso total de la composición.

Dicho gel es más particularmente conveniente para administración por vía tópica.

También puede presentarse en forma de crema, ungüento, pomada o de cualquier otro tipo de formulación conocida por el experto en la técnica y apropiada para las aplicaciones previstas.

Nanopartículas según la invención

20 Inesperadamente, los inventores han encontrado que el conjugado formado por copulación covalente de al menos una molécula de vitamina C considerada según la invención con al menos un compuesto hidrocarbonado en el sentido de la invención, muestra una capacidad para organizarse bajo una forma compacta en un medio disolvente polar, y conduce así a la formación de nanopartículas.

25 Así, según otro de sus aspectos, la presente invención tiene como objetivo las nanopartículas del complejo de acuerdo con la invención.

En general, las nanopartículas así obtenidas poseen un tamaño medio que varía de 30 nm a 500 nm, en particular de 40 nm a 250 nm, incluso de 45 nm a 95 nm, medido por difusión de la luz mediante el medidor de tamaños de nanopartículas Coulter® N4MD, Coulter Electronics, Hialeah, USA.

30 Por tanto, estas partículas poseen un tamaño que se muestra compatible con cualquier modo de administración, en particular tópica, inyectable y oral.

Como se ha especificado anteriormente, la formulación de nanopartículas es conveniente en la medida en que permite en particular formular de manera estabilizada el complejo según la invención en medio acuoso y aumentar la penetración de la vitamina C hasta las capas profundas de la piel.

35 Las nanopartículas según la invención son, por supuesto, susceptibles de llevar en la superficie una multitud de funciones reactivas, como las funciones hidroxilo o amina por ejemplo. Por tanto es concebible fijar en estas funciones todo tipo de moléculas, en particular mediante enlaces covalentes.

A modo ilustrativo y no limitativo de este tipo de moléculas susceptibles de asociarse a las nanopartículas, se pueden mencionar en particular las moléculas de tipo marcador, los compuestos susceptibles de proporcionar una

función de dianización, así como cualquier compuesto capaz de conferirles características farmacocinéticas específicas. En lo que respecta a este último aspecto se puede así considerar la fijación, en la superficie de estas nanopartículas, de los derivados lipófilos de poli(etilenglicol), como por ejemplo el conjugado de poli(etilenglicol)/colesterol, poli(etilenglicol)-fosfatidiletanolamina o mejor aún poli(etilenglicol)/escualeno. En efecto, dada la afinidad natural de los residuos de escualeno entre sí, el conjugado de poli(etilenglicol)/escualeno se asocia, en este caso, con las nanopartículas según la invención, y conduce así a la formación de nanopartículas revestidas de poli(etilenglicol) en la superficie. Por otra parte, y como se ha mencionado anteriormente, el conjugado de poli(etilenglicol)/escualeno actúa convenientemente, durante el proceso de formación de las nanopartículas según la invención, como tensioactivo debido a su comportamiento anfifílico y estabiliza por tanto la suspensión coloidal, reduciendo así el tamaño de las nanopartículas formadas.

Según un modo de realización conveniente, las nanopartículas según la invención se formulan en estado de dispersión acuosa.

Según otro modo de realización conveniente, las nanopartículas según la invención están en forma de liofilizado.

Preferiblemente, se trata de nanopartículas de 4,8,13,17,21-pentametil-docosa-4,8,12,16,20-pentaenoato de 2-(3,4-dihidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-furan-2-il)-2-hidroxi-etilo (también llamado 1,1',2-trisnor-escualenato de 2-(3,4-dihidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-furan-2-il)-2-hidroxi-etilo o ácido escualenoil-ascórbico o incluso escualenoil-vitamina C) y preferiblemente de nanopartículas de ácido 6-escualenoil-ascórbico (también llamado 6-escualenoil-vitamina C).

También puede tratarse de nanopartículas de (5R)-5-[(1S)-1,2-dihidroxi-etil]-4-hidroxi-3-[[[(4E,8E,12E,16E)-4,8,13,17,21-pentametildocosa-4,8,12,16,20-pentaen-1-il]oxi]-2,5-dihidrofuran-2-ona, también llamadas nanopartículas de ácido 2-escualenil-ascórbico o incluso nanopartículas de 2-escualenil-vitamina C.

Incluso también puede tratarse preferiblemente de nanopartículas de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3-hidroxi-4-[[[(8E,12E,16E)-4,8,13,17,21-pentametildocosa-4,8,12,16,20-pentaen-1-il]oxi]-2,5-dihidrofuran-2-ona, también llamadas nanopartículas de ácido 3-escualenil-ascórbico o incluso nanopartículas de 3-escualenil-vitamina C.

Procedimiento para la preparación de las nanopartículas

Más precisamente, las nanopartículas se forman colocando el conjugado en presencia de un medio acuoso en condiciones propicias para su aglomeración en estado de nanopartículas. En particular puede tratarse de métodos llamados de nanoprecipitación o de emulsión/evaporación de disolvente.

Las nanopartículas según la presente invención pueden obtenerse convenientemente de la siguiente manera.

Un complejo o conjugado según la invención se dispersa en al menos un disolvente orgánico (por ejemplo, un alcohol como el etanol, o acetona) a una concentración suficiente para obtener, durante la adición de la mezcla resultante a una fase acuosa con agitación y generalmente gota a gota, la formación instantánea de nanopartículas según la invención en suspensión en dicha fase acuosa. Si es necesario, se procede al aislamiento de dichas nanopartículas según las técnicas bien conocidas por el experto en la técnica.

La nanoprecipitación generalmente se puede realizar a temperatura ambiente. Cualquiera que sea, la temperatura de implementación no debe afectar a la actividad de la molécula de vitamina C considerada. El procedimiento para la preparación de las nanopartículas según la invención es particularmente conveniente en la medida en que no requiere necesariamente la presencia de tensioactivos.

Esta propiedad es particularmente apreciable en la medida en que un gran número de tensioactivos no resulta ser compatible con una aplicación in vivo.

Por tanto, otra ventaja de la presente invención es que ningún disolvente orgánico ni tensioactivo potencialmente tóxicos se requieren para la elaboración de dichas composiciones de acuerdo con la invención.

Sin embargo, se entiende que se puede considerar en el marco de la invención el uso de tensioactivos, en general convenientemente desprovistos de cualquier toxicidad. Este tipo de tensioactivos puede, por otra parte, proporcionar acceso a tamaños incluso más pequeños durante la formación de nanopartículas. A modo de ilustración no limitativa de este tipo de tensioactivos susceptibles de utilizarse en la presente invención, se pueden mencionar en particular copolímeros de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno), derivados fosfolipídicos y derivados lipófilos de poli(etilenglicol).

Como derivado lipófilo de poli(etilenglicol) se puede mencionar, por ejemplo, poli(etilenglicol)-colesterol. Como ejemplo de copolímeros de bloques de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno), se pueden mencionar en particular los copolímeros tribloque de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno), llamados también poloxámeros®, plurónicos® o sinperónicos y que están comercializados, en particular, por la sociedad BASF.

Relacionadas con estas familias de copolímeros, las poloxaminas, que están constituidas por segmentos hidrófobos (a base de poli(oxipropileno)), segmentos hidrófilos (a base de poli(oxietileno)) y por una parte central que se deriva del motivo etilendiamina, también se pueden utilizar.

Composición según la invención

Un conjugado y/o nanopartículas que son adecuados para la invención, se pueden formular convenientemente en una composición que puede presentarse en cualquier forma galénica normalmente disponible para el modo de administración elegido.

- 5 Como se especifica más adelante, la elección de la forma considerada para el conjugado, es decir, en partículas o no en partículas, se puede realizar teniendo en cuenta la naturaleza del medio de formulación galénica particularmente considerado.

Por tanto, en el caso de una fórmula monofásica o multifásica tal como una emulsión, el complejo podrá formularse convenientemente en estado de nanopartículas en la fase acuosa.

- 10 En cambio, para una forma galénica de tipo crema monofásica y destinada a ser administrada por vía tópica, es conveniente favorecer la utilización de una formulación del complejo según la invención en forma de un gel oleoso, y más particularmente del complejo según la invención en mezcla con escualeno.

- 15 Se puede considerar formular al menos un conjugado y/o nanopartículas de acuerdo con la presente invención en una proporción de 0,1 a 10% en peso, expresado en peso de vitamina C activa, incluso más, con respecto al peso total de la composición considerada.

Una composición de la invención comprende un medio fisiológicamente aceptable.

Por "medio fisiológicamente aceptable" se entiende un medio no tóxico que se puede aplicar a la piel, y de aspecto, olor y tacto agradables.

Una composición de la invención puede ser una composición cosmética, dermatológica, o farmacéutica.

- 20 Preferiblemente, una composición de la invención puede administrarse por vía tópica.

Según un modo de realización, una composición de la invención administrada por vía tópica puede formularse convenientemente en cualquier forma galénica conveniente para el cuidado de la piel y de las mucosas y puede presentarse en forma de ungüento, cremas, leches, pomadas, disoluciones, geles, aerosoles, lociones, o suspensiones.

- 25 Una composición de la invención puede presentarse también en forma de un sistema transdérmico que permita una liberación activa o pasiva de las nanopartículas según la invención mediante transdermia, por ejemplo de tipo parche o parche de gel (hidrogel).

- 30 Estas composiciones se preparan según los métodos habituales. Los agentes de formulación y excipientes para composición tópica son conocidos en estos campos y en la presente memoria no son objeto de una descripción detallada.

Convenientemente, las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener otros ingredientes activos de los que puede ser beneficioso sacar provecho, junto con el efecto de la vitamina C.

Según otro objetivo, la presente invención se refiere a un complemento alimenticio que comprende al menos un complejo según la invención o nanopartículas según la invención.

- 35 La formulación de las composiciones para vía oral según la invención se puede realizar mediante cualquier procedimiento usual conocido por el experto en la técnica para producir disoluciones bebibles, grageas, píldoras, geles, emulsiones, comprimidos para tragar o masticar, cápsulas, en particular cápsulas blandas o duras, gránulos para disolver, jarabes, alimentos sólidos o líquidos e hidrogeles.

- 40 Un conjugado según la invención y/o nanopartículas según la invención también pueden incorporarse como tales en todas las formas de complementos alimenticios o alimentos enriquecidos, por ejemplo barras alimenticias, bebidas lácteas o no.

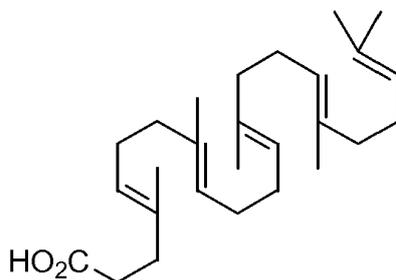
Los ejemplos presentes a continuación son ilustrativos y no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1a: preparación de 6-escualenoil-vitamina C (VitC-SQ)

45

a) Síntesis de ácido 1,1',2-tris-nor-escualénico



Se disuelven 2,77 g (7,2 mmoles) de aldehído 1,1',2-trisnoroescualénico (SQCHO) (Ceruti M. et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans, 1; 2002, 1477-1486) en 40 mL de acetona. La mezcla se enfría a 0°C en un baño de hielo y una disolución de reactivo de Jones (preparada previamente disolviendo 26,7 g de CrO₃ en 23 mL de H₂SO₄ concentrado y después aumentando con agua hasta un volumen de 100 mL) se añade lentamente hasta la obtención de una coloración roja marrón persistente. Se añaden algunas gotas de isopropanol para descomponer el exceso de cromo (VI). La mezcla se recoge en 30 mL de una disolución acuosa saturada de NaCl y se extrae con 4x50 mL de Et₂O. Se reúnen las fases orgánicas, se lavan con 30 mL de una disolución acuosa saturada de NaCl, se secan sobre MgSO₄ y después se filtran. Los disolventes se destilan a presión reducida para dar un aceite amarillo. El producto sin purificar se purifica por cromatografía en sílice (éter de petróleo/éter dietílico 80/20) para dar 1,34 g de ácido trisnoroescualénico.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ: 5,19-5,07 (5H, m, CH vinílicos); 2,45 (2H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₂COOH), 2,30 (2H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₂COOH), 2,09-1,98 (16H, m, CH₂ alílicos), 1,68 (3H, s, CH₃); 1,62 (3H, s, CH₃), 1,60 (12H, s, CH₃);

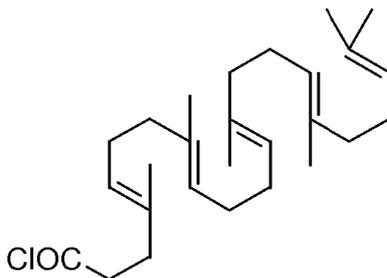
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ: 180,0 (CO), 135,0 (C), 134,8 (2 C), 132,8 (C), 131,1 (C), 125,3 (CH), 124,4 (2 CH), 124,2 (2 CH), 39,7 (2 CH₂), 39,5 (CH₂), 34,2 (CH₂) 33,0 (CH₂), 28,2 (2 CH₂), 26,8 (CH₂), 26,6 (2 CH₂), 25,6 (CH₃), 17,6 (CH₃), 16,0 (4 CH₃).

IR (cm⁻¹): 2966, 2916, 2857, 1709, 1441, 1383, 1299, 1212, 1155, 1103;

CIMS (isobutano) m/z 401 (100);

EIMS m/z (%): 400 (5), 357 (3), 331 (5), 289 (3), 208 (6), 136 (3), 81 (100)

b) Síntesis del cloruro de ácido 1,1',2-tris-nor-escualénico (o cloruro de 4,8,13,17,21-pentametil-docosa-4,8,12,16,20-pentaenoílo)



Se colocan en disolución 1,80 g de ácido tris-nor-escualénico (4,5 mmoles) obtenido previamente en 10 mL de tolueno. La disolución así obtenida se desgasifica pasando una corriente de nitrógeno. Después, a esta disolución se añaden gota a gota a 20°C 1,2 mL de cloruro de oxalilo (1,74 g, 13,8 mmoles). La mezcla se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 3 h.

La disolución se concentra a presión reducida para proporcionar el cloruro de ácido del ácido 1,1',2-tris-nor-escualénico sin purificar en forma de un aceite amarillo.

IR (película) δ: 2920, 1799, 1443, 1382, 955, 893;

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,23-5,10 (m, 5 H), 2,45 (t, *J* = 7,3 Hz, 2 H, CH₂CH₂COCl), 2,30 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, CH₂CH₂COCl), 2,15-1,95 (m, 16 H), 1,70 (s, 3H), 1,62 (s, 15H);

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173,2 (C, COCl), 135,1 (C, C=CH), 134,8 (C, C=CH), 134,6 (C, C=CH), 131,4 (C, C=CH), 131,1 (C, C=CH), 126,6 (CH, C=CH), 124,7 (CH, C=CH), 124,4 (CH, C=CH), 124,3 (2 CH, C=CH), 45,8 (CH₂), 39,7 (2 CH₂), 34,4 (CH₂), 34,6 (CH₂), 28,2 (2CH₂), 26,8 (CH₂), 26,7 (CH₂), 26,5 (CH₂), 25,7 (CH₃, C=C(CH₃)₂), 17,6 (CH₃), 16,0 (CH₃), 15,9 (2 CH₃), 15,8 (CH₃).

c) Síntesis de 6-escualenoil-vitamina C o ácido 6-O-[4,8,13,17,21-pentametil-docosa-4,8,12,16,20-pentaenoil]-ascórbico (VitC-SQ)

c-1) Primera ruta (condensación con el cloruro de ácido obtenido en el ejemplo 1a)b))

5 Una corriente de ácido clorhídrico HCl seco se pone a burbujear hasta saturación en 10 mL de N-metilpiperidona (NMP) colocados en un frasco lavador de Durand (apelmazamiento).

10 El sólido se disuelve por adición de 10 mL de NMP. 0,70 g de ácido ascórbico (4,0 mmoles) se disuelven en 10 mL de la disolución obtenida anteriormente y la mezcla se enfría a 0°C. Después, se añaden 418 mg del cloruro de ácido preparado según el ejemplo 1a)b) (1,0 mmol) y la mezcla así obtenida se agita a temperatura ambiente durante 24 h. Se añaden entonces 20 mL de agua y la mezcla se extrae con acetato de etilo (4 x 20 mL). La fase orgánica se lava con agua (2 x 5 mL), se seca sobre MgSO₄ y se concentra a presión reducida. La NMP que queda en el residuo se destila a presión reducida (0,05 mm de Hg, 60°C) para dar un residuo espeso que se cromatografía en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo y después con una mezcla de AcOEt/MeOH, 98:2, para proporcionar 6-escualenoil-vitamina C en forma de un aceite espeso de color amarillo pálido (190 mg, 34%).

c-2) Segunda ruta (esterificación catalizada por una lipasa Novozyme 435®)

15 Se pone en suspensión ácido ascórbico (352 mg, 2 mmoles) en 10 mL de alcohol terc-amílico anhidro, seguido por 300 mg de Novozyme 435® (Sigma L4777), 400 mg de ácido tris-nor-escualénico preparado según el ejemplo 1a)a) (1,0 mmol) y 500 mg de tamiz molecular de 4 Å. La mezcla se coloca en un Rotavapor y se calienta a 50°C a 300 mbar (30 kPa) agitando lentamente. Después de 48 h, la mezcla se enfría, se filtra sobre Célite y el filtrado se concentra a presión reducida. El residuo así obtenido se cromatografía en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo y después con una mezcla de AcOEt/MeOH, 98:2, para proporcionar un complejo de 6-escualenoil-vitamina C en forma de un aceite espeso amarillo pálido (167 mg, 30%).

[α]_D = +10 (c = 0,5, EtOH);

IR (película) ν : 2976, 2857, 1744, 1696, 1443, 1382, 1350, 1296, 1151, 1119;

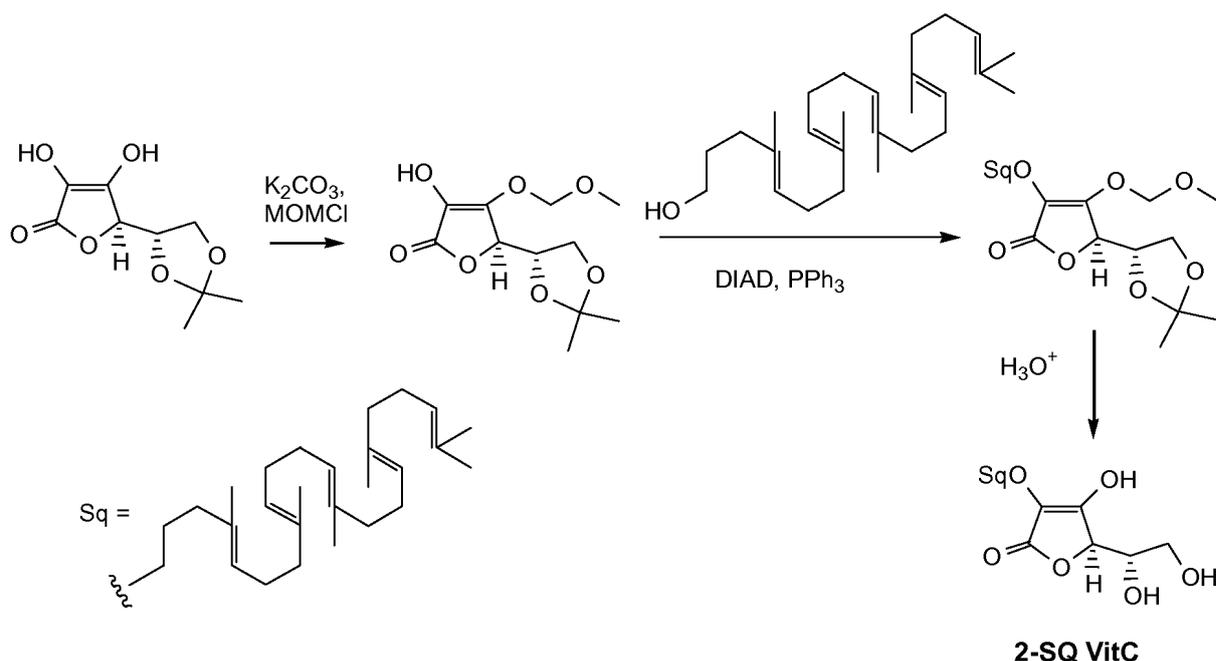
25 RMN 1H (400 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 5,20-5,00 (m, 5H), 4,68 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 4,28-4,01 (m, 3H), 2,43 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,35-2,22 (m, 2H), 2,10-1,90 (m, 16H), 1,63 (s, 3H), 1,58 (s, 3H), 1,56 (s, 12H);

30 RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174,6 (C, CO), 173,1 (C, CO), 154,8 (C, C3), 135,9 (C, C=CH), 135,8 (C, C=CH), 135,8 (C, C=CH), 134,4 (C, C=CH), 132,0 (C, C=CH), 126,5 (CH, C=CH), 125,6 (CH, C=CH), 125,5 (CH, C=CH), 125,4 (2CH, C=CH), 120,0 (C, C2), 77,1 (CH, C4), 67,9 (CH, C5), 65,7 (CH₂, C6), 40,8 (2CH₂), 40,6 (CH₂), 35,6 (CH₂), 33,9 (CH₂), 29,2 (2CH₂), 27,8 (CH₂), 27,7 (CH₂), 27,6 (CH₂), 26,0 (CH₃, C=C(CH₃)₂), 17,8 (CH₃), 16,3 (3CH₃), 16,1 (CH₃);

SM (+APCI) m/z (%): 559,6 (100) [M + H].

Ejemplo 1b: preparación del ácido 2-escualenil-ascórbico (2-SQ Vit C) o (5R)-5-[(1S)-1,2-dihidroxi-etil]-4-hidroxi-3-[[[(4E,8E,12E,16E)-4,8,13,17,21-pentametil-docosa-4,8,12,16,20-pentaen-1-il]oxi]-2,5-dihidrofuran-2-ona

35 El ácido 5,6-O-isopropiliden-L-ascórbico ha sido protegido en forma de éter de metoximetilo según el procedimiento de Kulkarni y col. (M. G. Kulkarni y S. R. Thopate, Tetrahedron, 1996, 52, 1293). Una reacción de Mitsunobu (C. Cena et al. Bioorg. Med. Chem. 2008, 16, 5199) con 1,1',2-trisnoroescualenol seguida de una hidrólisis proporciona el ácido 2-escualenil-ascórbico (2-SQ Vit C) con un rendimiento global de 32%.



a) (5R)-5-[(4S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il]-3-hidroxi-4-(metoximetoxi)-2,5-dihidrofuran-2-ona.

A una disolución de ácido 5,6-isopropiliden-ascórbico (6,0 g, 27,7 mmoles) en acetona (145 mL) se añaden 3,86 g de K_2CO_3 anhidro (28 mmoles) y la mezcla se agita vigorosamente. 2,1 mL de cloro(metoxi)metano (28 mmoles) en acetona (10 mL) se añaden gota a gota durante un periodo de dos horas. La agitación se continúa a reflujo durante 4 h más. Después de enfriar, el sólido se filtra y se lava con acetona. El filtrado se ha concentrado a vacío y el residuo se ha purificado por cromatografía en gel de sílice eluyendo con una mezcla de ciclohexano / AcOEt / acetona 6:1:1 para dar el compuesto de metoximetil-éter en forma de un sólido blanco (4,7 g, 65%).

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ : 7,00-6,50 (s ancho, 1H, OH), 5,33 (d, $J = 6,02$ Hz, 1H, $MeOCH_2O$), 5,31 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H, $MeOCH_2O$), 4,56 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H, H-4), 4,26 (td, $J = 6,7$ Hz, $J = 3,3$ Hz, 1H, H-5), 4,10 (dd, $J = 8,5$, 6,8 Hz, 1H, H-6), 3,98 (dd, $J = 8,5$ Hz, $J = 6,7$ Hz, 1H, H-6), 3,54 (s, 3H, CH_3OCH_2), 1,30 (s, 3H, $OC(CH_3)_2O$), 1,24 (s, 3H, $OC(CH_3)_2O$),

b) (5R)-5-[(4S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il]-4-(metoximetoxi)-3-[[4E,8E,12E,16E]-4,8,13,17,21-pentametildocosa-4,8,12,16,20-pentaen-1-il]oxi]-2,5-dihidrofuran-2-ona.

A una disolución de trifetilfosfina (326 mg, 1,25 mmoles) en THF anhidro (2 mL) enfriada a $-15^\circ C$ se añaden 251 mg de DIAD (1,25 mmoles). Después de 15 minutos se forma un precipitado blanco de betaina de Mitsunobu. La agitación se continúa durante 10 minutos, y después se añade una disolución de 5-(2,2-dimetil-[1,3]dioxolan-4-il)-3-hidroxi-4-metoximetoxi-5H-furan-2-ona (246 mg, 1,19 mmoles) en THF (2 mL) seguida por 400 mg de 1,1',2-trisnorescualenol (1,04 mmoles) en 2 mL de THF. La mezcla se agita a $-15^\circ C$ durante 30 min, y después se deja la reacción volver a temperatura ambiente manteniendo la agitación durante un periodo adicional de 2 h. La mezcla de reacción se concentra después, el residuo se recoge en 20 ml de acetato de etilo y la fase orgánica se lava sucesivamente con una disolución saturada de bicarbonato sódico (3 ml) y después con una disolución saturada de NaCl (3 ml). Las fases orgánicas se secan sobre sulfato magnésico y se concentran a presión reducida. La mezcla sin purificar se purifica por cromatografía flash en gel de sílice eluyendo con una mezcla de ciclohexano / AcOEt (1:1) para dar el ácido escualenil-ascórbico totalmente protegido en forma de un aceite incoloro (438 mg, 67%).

$[\alpha]_D +12,3$ ($c = 2$, $CHCl_3$);

IR (película, cm^{-1}) 3400, 2963, 2889, 2824, 1647, 1580, 1540, 1374, 1121, 1100, 1026;

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5,47 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, OCH_2OCH_3), 5,44 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, OCH_2OCH_3), 5,20-5,05 (m, 5H, $=CH(CH_3)$), 4,56 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, H-4), 4,32 (td, $J = 6,7$ Hz, $J = 2,8$ Hz, 1H, H-5), 4,18-4,00 (m, 4H, H-6, $OCH_2CH_2CH_2C(CH_3)$), 3,52 (s, 3H, OCH_3), 2,12-1,95 (m, 18H, $=CCH_2CH_2C(CH_3)$), 1,82-1,74 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2C(CH_3)$), 1,68 (s, 3H, $=C(CH_3)_2$), 1,61 (s, 15H, $=CH(CH_3)$), 1,39 (s, 3H, $OC(CH_3)_2O$), 1,36 (s, 3H, $OC(CH_3)_2O$);

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 168,7 (C, C-1), 153,2 (C, C-3), 135,1 (C, $=C(CH_3)CH_2$), 135,0 (C, $=C(CH_3)CH_2$), 134,8 (C, $=C(CH_3)CH_2$), 134,0 (C, $=C(CH_3)CH_2$), 131,2 (C, $=C(CH_3)_2$), 124,8 (CH, $=CH(CH_3)$), 124,4 (CH, $=CH(CH_3)$), 124,3 (CH, $=CH(CH_3)$), 124,2 (2CH, $=CH(CH_3)$), 123,1 (C, C-2), 110,3 (C, $OC(CH_3)_2O$), 96,5 (CH_2 , OCH_2O), 74,3 (CH, C-4),

73,8 (CH, C-5), 71,8 (CH₂, OCH₂CH₂CH₂C(CH₃)), 65,2 (CH₂, C-6), 57,3 (CH₃, OCH₃), 39,7 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 39,6 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 35,6 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 28,3 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 28,2 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 26,7 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 26,7 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 26,6 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 25,8 (CH₃, =C(CH₃)₂), 25,7 (CH₃, OC(CH₃)₂O), 25,6 (CH₃, OC(CH₃)₂O), 17,6 (CH₃, =CH(CH₃)), 16,1 (2 CH₃, =CH(CH₃)), 16,0 (CH₃, =CH(CH₃)), 15,8 (CH₃, =CH(CH₃));

MS (+APCI) *m/z* (%): 629,7 (100) [M+H]⁺.

c) (5*R*)-5-[(1*S*)-12-dihidroxietil]-4-hidroxi-3-[[*(4E,8E,12E,16E)*-4,8,13,17,21-pentametildocosa-4,8,12,16,20-pentaen-1-il]oxi]-2,5-dihidrofuran-2-ona (2-SQ VitC).

A una disolución del compuesto anterior (400 mg, 0,63 mmoles) en metanol (40 ml) se añaden 20 mL de una disolución de HCl 3 N y la mezcla resultante se agita a 50°C durante 4 h. La mezcla de reacción se enfría después a temperatura ambiente y el metanol se destila a presión reducida. El residuo se extrae con acetato de etilo (3 x 50 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavan sucesivamente con una disolución saturada de bicarbonato sódico (10 mL) y después con una disolución saturada de NaCl (10 mL), se secan sobre sulfato magnésico y se concentran a presión reducida. El producto sin purificar se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice RP-18 eluyendo con una mezcla de acetonitrilo/agua (95/5) para dar el ácido 2-escualenil-ascórbico (260 mg, 75 %).

[α]_D +13,4 (c = 2, CHCl₃);

IR (película, cm⁻¹) 3400-3100, 1700, 1650, 1588, 1559, 1383, 1143, 1109, 1085 ;

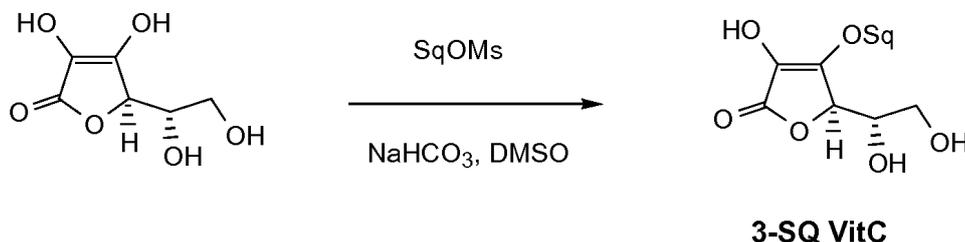
¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 5,20-5,05 (m, 5H, =CH(CH₃)), 4,72 (s, 1H, H-4), 3,93 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂C(CH₃)), 3,68 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, H-6), 2,12-1,94 (m, 18H, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 1,84-1,73 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂C(CH₃)), 1,67 (s, 3H, =C(CH₃)₂), 1,62 (s, 3H, =CH(CH₃)), 1,61 (s, 6H, =CH(CH₃)), 1,60 (s, 6H, =CH(CH₃)),

¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 174,0 (C, C-1), 165,1 (C, C-3), 136,2 (C, =C(CH₃)CH₂), 135,9 (C, =C(CH₃)CH₂), 135,8 (C, =C(CH₃)CH₂), 135,4 (C, =C(CH₃)CH₂), 132,0 (C, =C(CH₃)₂), 125,7 (CH, =CH(CH₃)), 125,6 (CH, =CH(CH₃)), 125,5 (CH, =CH(CH₃)), 125,4 (2CH, =CH(CH₃)), 121,1 (C, C-2), 77,4 (CH, C-4), 73,0 (CH₂, OCH₂CH₂CH₂C(CH₃)), 70,9 (CH, C-5), 63,4 (CH₂, C-6), 40,9 (2CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 36,8 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 29,2 (2CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 27,8 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 27,7 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 27,6 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 27,5 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 25,9 (CH₃, =C(CH₃)₂), 17,8 (CH₃, =CH(CH₃)), 16,2 (3CH₃, =CH(CH₃)), 16,0 (CH₃, =CH(CH₃));

MS (-ESI) *m/z* (%): 543,5 (100) [M-H]⁻.

Ejemplo 1c: Preparación de ácido 3-escualenil-ascórbico (3-SQ Vit C) o 5-(1,2-dihidroxietil)-3-hidroxi-4-[[*(8E,12E,16E)*-4,8,13,17,21-pentametildocosa-4,8,12,16,20-pentaen-1-il]oxi]-2,5-dihidrofuran-2-ona.

La alquilación directa del mono-anión del ácido ascórbico por mesilato de 1,1',2-trisnorescualenol utilizando NaHCO₃ como base en DMSO según el método de Beifuss (U. Beifuss et al. *Tetrahedron* 2000, 56, 357) proporciona 3-SQ VitC con un rendimiento de 37% después de la cromatografía en sílice RP18.



35

a) Metanosulfonato de 4,8,12,17,21,25-(*4E,8E,12E,16E*)-hexametil-hexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaenilo.

A una disolución de 1,1',2-trisnorescualenol (475 mg, 1,23 mmoles) en diclorometano (5 mL) enfriada a 0°C, se añaden sucesivamente con jeringa 205 mg de Et₃N (2,03 moles) y 177 mg de MsCl (1,54 mmoles). Se añaden algunos cristales de DMAP y la mezcla de reacción se agita a 0°C durante 30 min y después 1 h a 20°C. Se añade una disolución de HCl 0,1 N (5 ml) y la mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavan sucesivamente con una disolución saturada de bicarbonato sódico (5 mL) y después con una disolución saturada de NaCl (5 mL), se secan sobre sulfato magnésico y se concentran a presión reducida para proporcionar mesilato de escualenilo en forma de un aceite amarillo pálido (582 mg, 89%). La mezcla sin purificar se utiliza directamente en la etapa siguiente.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 5,20-5,05 (m, 5H, =CH(CH₃)), 4,19 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂OSO₂CH₃), 2,99 (s, 3H, SO₂CH₃), 2,16-1,95 (m, 18H, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 1,88-1,75 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂C(CH₃)), 1,67 (s, 3H, =C(CH₃)₂),

1,60 (s, 15H, =CH(CH₃)),

b) Acido 3-escualenil-ascórbico (3-SQ VitC) o 5-(1,2-dihidroxietil)-3-hidroxi-4-[[[(8E,12E,16E)-4,8,13,17,21-pentametildocosa-4,8,12,16,20-pentaen-1-il]oxi]-2,5-dihidrofuran-2-ona.

5 A una disolución de ácido L-ascórbico (776 mg, 4,4 mmoles) en DMSO anhidro (4,4 mL) se añaden 1,29 g de NaHCO₃ (15,4 mmoles) y después 600 mg de 1,1',2-trisnor-escualenilmetanosulfonato (1,26 mmoles). La mezcla de reacción se agita a 60°C durante 48 h y después se concentra a presión reducida. El residuo se trata con 2 mL de HCl 2 N y se extrae con acetato de etilo (3 x 15 ml). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre MgSO₄ y el disolvente se destila a presión reducida. El producto sin purificar se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice RP-18 eluyendo con una mezcla de acetonitrilo/H₂O (95:5) para dar ácido 3-escualenil-ascórbico (3-SQ Vit C) (293 mg, 37%) en forma de un aceite amarillo pálido.

10 $[\alpha]_D +9,7$ (c = 3,2, CHCl₃);

IR (película, cm⁻¹) 3400, 2950-2830, 1756, 1695, 1680, 1450, 1352, 1331, 1218, 1150, 1111;

15 ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ: 6,00-7,00 (s ancho, 1H, =C(OH)), 5,22-5,05 (m, 5H, =CH(CH₃)), 4,76 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-4), 4,55-7,40 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂C(CH₃)), 3,87 (ddd, J = 7,4, 5,9, 3,0 Hz, 2H, H-5), 3,72-3,85 (m, 2H, H-6), 2,15-1,95 (m, 18H, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 1,90-1,80 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂C(CH₃)), 1,67 (s, 3H, =C(CH₃)₂), 1,63 (s, 3H, =CH(CH₃)), 1,60 (s, 12H, =CH(CH₃));

20 ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ: 174,0 (C, C-1), 164,1 (C, C-3), 136,0 (C, =C(CH₃)CH₂), 135,9 (C, =C(CH₃)CH₂), 135,8 (C, =C(CH₃)CH₂), 135,6 (C, C-2), 135,4 (C, =C(CH₃)CH₂), 132,0 (C, =C(CH₃)₂), 125,8 (CH, =CH(CH₃)), 125,6 (CH, =CH(CH₃)), 125,5 (CH, =CH(CH₃)), 125,4 (2CH, =CH(CH₃)), 77,2 (CH, C-4), 73,0 (CH₂, OCH₂CH₂CH₂C(CH₃)), 70,8 (CH, C-5), 63,4 (CH₂, C-6), 40,9 (2CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 36,9 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 36,6 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 29,2 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 29,1 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 27,8 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 27,7 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 27,6 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 27,5 (CH₂, =CCH₂CH₂C(CH₃)), 25,9 (CH₃, =C(CH₃)₂), 17,8 (CH₃, =CH(CH₃)), 16,2 (3CH₃, =CH(CH₃)), 16,0 (CH₃, =CH(CH₃));

MS (+ESI) m/z (%): 567,6 (100) [M+Na]⁺.

25 Ejemplo 2a: preparación de nanopartículas de 6-escualenoil-vitamina C (VitC-SQ)

Las nanopartículas se obtienen mediante el método de precipitación/evaporación de disolvente, por analogía con el método descrito en Fessi *et al.*, Int. J. Pharm., 55, 1989, R1-R4.

30 Una disolución de 7,6 mg de vitamina C-escualenizada en etanol (0,5 mL) se añade gota a gota a 1 mL de una disolución acuosa (agua MilliQ®) al 3% de Pluronic® F68 con agitación magnética (500 rpm). Las partículas se forman instantáneamente. El frasco que contiene la disolución de VitC-SQ se enjuaga con 0,1 mL de etanol y la disolución de enjuague se añade a la suspensión de nanopartículas.

35 Después de 2 ó 3 minutos de agitación, la suspensión de nanopartículas se transfiere a un matraz de 100 mL calibrado y se concentra a presión reducida en rotavapor (50-100 mbar (5-10 kPa) a 20°C durante 10 min y después a 37°C durante aproximadamente 3-5 minutos) hasta un peso de 0,8 - 0,9 g. La disolución se completa después hasta 1,0 g utilizando agua MilliQ®.

En agua pura, las nanopartículas de VitC-SQ están polidispersadas.

En cambio, en presencia de 3% en peso de Pluronic® F68, el método de precipitación/evaporación de disolvente proporciona nanopartículas de un tamaño medio de 51 nm con una baja polidispersidad (0,08). El tamaño de las nanopartículas obtenidas se mide con un medidor de tamaños de partículas (Zetasizer® de la sociedad Malvern).

40 Ejemplo 2b: preparación de las nanopartículas de 3-escualenil-vitamina C (3-SQ VitC).

Una disolución de 3-SQ Vit C (5,6 mg) en 0,5 ml de etanol se añade gota a gota, con agitación (500 rpm), a 1,5 mL de agua milliQ. La precipitación de las nanopartículas se produce espontáneamente. La agitación se continúa durante 2 ó 3 min. La suspensión de nanopartículas se transfiere después a un matraz de fondo redondo calibrado y el etanol se destila a presión reducida (50-100 mbar (5-10 kPa)) durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente y después a 30°C durante aproximadamente 3-5 min. La evaporación se continúa hasta un peso del contenido de aproximadamente 1,3 a 1,4 g. El peso de la suspensión se ajusta entonces a 1,5 g con agua milliQ o una disolución acuosa al 5% de dextrosa. El diámetro hidrodinámico medio de las nanopartículas se ha determinado a 20°C por difusión cuasi elástica de la luz según a un ángulo de 90° con un Nanosizer de Malvern (Malvern Instruments SA, Orsay, France) en una cubeta de cuarzo (longitud de camino de 10 mm). Las muestras se han preparado por dilución 10 veces en el agua de la disolución madre. El diámetro hidrodinámico medio se da en número ponderado sobre todas las poblaciones (Z media). Se ha observado un diámetro medio 69 nm con un índice de polidispersidad de 0,22. Las nanopartículas son estables durante un periodo de tres días.

Ejemplo 3: preparación del gel de 6-escualenoil-vitamina C (VitC-SQ) en escualeno

5 En un envase de 5 mL, se añaden 110 mg de escualeno (0,27 mmoles) a 15 mg de VitC-SQ obtenido según el ejemplo 1a (0,027 mmoles). La mezcla se agita vigorosamente 2 min a 40°C, y luego se somete a una sonicación en un tanque de ultrasonidos durante 1 min. Después de enfriar, se obtiene un gel homogéneo al 3% en peso expresado en peso de vitamina C, es decir, el 10% en moles en VitC-SQ.

Ejemplo 4: Evaluación de la actividad “antienvjecimiento” del complejo de VitC-SQ

10 Se han utilizado explantes de piel humana de un diámetro de aproximadamente 10 mm, obtenidos a partir de residuos quirúrgicos de cirugía estética y, más particularmente, provenientes de una cirugía plástica abdominal de mujeres de aproximadamente treinta años. La piel humana se mantiene viva en un medio nutritivo habitual a 37°C en atmósfera húmeda, enriquecida con 5% de CO₂, durante diez días.

15 Los explantes de piel humana se tratan por medio de un gel según la invención, que comprende el complejo o conjugado VitC-SQ de acuerdo con la invención obtenido en el ejemplo 1a formulado en escualeno, como se ha descrito en el ejemplo 3, para obtener composiciones que comprenden respectivamente 1% y 3% en peso, expresado en peso de vitamina C activa con respecto al peso total de la composición. Para obtener respectivamente valores de 1% y 3% expresado en peso de vitamina C, la concentración del complejo VitC-SQ se ajusta en consecuencia.

En paralelo, se realizan tres pruebas de control.

La primera prueba de control está constituida por explantes de piel humana que no han sido tratados (control N°0).

20 Las otras dos pruebas de control utilizan respectivamente, como derivado de la vitamina C, vitamina C «libre» (control N°1) y un derivado de Vitamina C-palmitato, también denominado más adelante VitC-palm (control N°2) que puede ser proporcionado en particular por las sociedades Sigma-Aldrich o Alpha Aesar. Estos dos agentes activos se utilizan a una concentración de 1% y 3% en peso, expresado en peso de vitamina C activa con respecto al peso total de la composición.

25 Un gel que comprende el derivado VitC-Palm formulado en escualeno se prepara según el método indicado en el ejemplo 3 en el que VitC-SQ se reemplaza por VitC-Palm.

30 Para preparar un gel que contiene vitamina C «libre», se introducen en un vaso de precipitado de 50 mL 20 g de agua destilada estéril que se calienta a 50°C. Después se añaden con agitación mecánica 50 mg de agente de conservación seguido por 200 mg de vitamina C cristalizada. Posteriormente, se añaden 400 mg de carboximetilcelulosa (suministrada en particular por la sociedad Sigma-Aldrich) en pequeñas cantidades, mientras se evita la formación de grumos. Se detiene el calentamiento y se completa el peso inicial. Después, se deja enfriar con agitación suave hasta la formación del gel. Finalmente, el gel obtenido se transfiere a un frasco hermético.

Cada una de las composiciones probadas se aplica tópicamente, a razón de 2 mg por explante, sobre los explantes de piel humana por medio de una espátula en el día cero (J0), después en 1 día (J1), a los 3 días (J3), 6 días (J6) y finalmente 8 días (J8).

35 En el día cero, se toman los explantes del control N°0 y cada explante se corta en dos partes. Una primera mitad se fija en Bouin ordinaria y la otra mitad se congela a -80°C.

En el décimo día, se toman los explantes tratados con cada una de las composiciones y se someten a las mismas condiciones que los explantes del control N°0.

40 Después de 48 horas de fijación en Bouin ordinaria, las muestras se deshidratan y se impregnan de parafina por medio de un procesador automático de deshidratación Leica 1020. Después se colocan en bloque según el procedimiento MO-H-153 por medio de una estación de revestimiento Leica EG 1160.

Se realizan cortes de 5 µm mediante un microtomo de tipo Minot, Leica RM 2125 y se pegan sobre portaobjetos histológicos superfrost silanizados.

45 Se realizan observaciones microscópicas mediante microscopía óptica, utilizando un microscopio Leica modelo Orthoplan, con objetivos x25 y x40. Las tomas de imagen se realizan con una cámara tri CCD Sony DXC 390P y se almacenan mediante el software de archivo de datos Leica IM1000.

El efecto de cada uno de los agentes activos se caracteriza como sigue.

a) Evaluación de la acantosis

50 La acantosis de la piel, y más generalmente la observación de la morfología general se realiza sobre cortes en parafina después de una tinción tricrómica de Masson, variante de Goldner según el procedimiento MO-H-157.

En el tiempo T0, es decir, antes de la aplicación tópica de las composiciones, se observa que el estrato córneo es grueso, muy ligeramente estratificado, ligeramente queratinizado en la superficie y en su base.

Además, la epidermis presenta 4 a 5 capas celulares con una buena morfología y el relieve de la unión dermo-epidérmica es claro.

- 5 Además, la dermis papilar muestra fibras de colágeno gruesas que forman una red más o menos densa y bien celularizada.

Estas observaciones son evidentemente similares para los explantes no tratados del control N°0.

En el décimo día (J10), para los explantes no tratados (control N°0), la morfología general es cercana a la observada en T0.

- 10 b) Evaluación de la expresión de los GAGs.

Los GAGs neutros, reservas de los factores de crecimiento cerca de la unión dermo-epidérmica, y los GAGs ácidos, principalmente ácido hialurónico, se examinan en cortes de parafina después de la tinción con azul alcian P.A.S. (tinción de Mowry).

- 15 Antes de la aplicación tópica de las composiciones (T0) y también para explantes no tratados (control N°0), se observa que los GAGs neutros son muy moderados, formando una banda rosa/violeta muy irregular y delgada a lo largo de la unión dermo-epidérmica. Además, son débiles en la dermis papilar subyacente.

Por otra parte, los GAGs ácidos no son moderados en los espacios intercelulares epidérmicos así como en la dermis papilar.

- 20 En el día J10, para los explantes no tratados (control N°0), la expresión de los GAGs neutros aumenta ligeramente en comparación con la observada en T0 y los GAGs ácidos están sobreexpresados muy moderadamente en los espacios intercelulares epidérmicos.

Las observaciones, realizadas el día J10 en comparación con el control N°0, sobre los explantes tratados se resumen en la siguiente tabla:

Explantos tratados	Observaciones
VitC-SQ según la invención al 1%	Ligera estimulación epidérmica Estimulación dérmica moderada Débil sobreexpresión de los GAGs neutros Sin sobreexpresión de los GAGs ácidos epidérmicos
VitC-SQ según la invención al 3%	Clara estimulación epidérmica Estimulación dérmica bastante clara Clara sobreexpresión de los GAGs neutros Sin sobreexpresión de los GAGs ácidos epidérmicos
Vitamina C libre al 1% (control N°1)	Sin estimulación epidérmica Sin estimulación dérmica Sin sobreexpresión de los GAGs neutros Sin sobreexpresión de los GAGs ácidos epidérmicos
Vitamina C libre al 3% (control N°1)	Sin estimulación epidérmica Estimulación dérmica moderada Sin sobreexpresión de los GAGs neutros Sin sobreexpresión de los GAGs ácidos epidérmicos
VitC-palm al 1% (control N°2)	Sin estimulación epidérmica Sin estimulación dérmica Débil sobreexpresión de los GAGs neutros Sin sobreexpresión de los GAGs ácidos epidérmicos

VitC-palm al 3% (control N°2)	Sin estimulación epidérmica Estimulación dérmica moderada Sobreexpresión muy moderada de los GAGs neutros Sin sobreexpresión de los GAGs ácidos epidérmicos
-------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

c) Evaluación de la expresión del colágeno III y del colágeno I.

5 Para esta evaluación, solo se utilizan algunos de los explantes de piel humana descritos anteriormente. Más particularmente, se trata de los explantes no tratados (control N°0) y de los explantes tratados por VitC-SQ según la invención al 3% en peso, por la Vitamina C libre al 3% en peso (control N°1) y por VitC-palm al 3% en peso (control N°2), expresado en peso de vitamina C activa con respecto al peso total de la composición.

Las observaciones microscópicas se realizan mediante microscopía óptica, utilizando un microscopio Leica modelo DMLB, con objetivo x40. Las tomas de imagen se han realizado con una cámara Olympus DP72 y mediante software de adquisición y archivo Olympus Cel^{AD}.

10 El marcaje del colágeno I se realiza sobre cortes congelados con un anticuerpo de conejo anti-colágeno I humano (Monosan ref PS047, policlonal), a 1/800 durante 1 hora a temperatura ambiente con un sistema amplificador de biotina/estreptavidina, revelado en fluorescencia (FITC caltag SA 1001). Los núcleos se han contrateñido con yoduro de propidio.

15 En lo que respecta al marcaje del colágeno III, éste último se marca sobre cortes de parafina (fijación en formol) con un anticuerpo policlonal de cabra anti-colágeno III humano (SBA ref. 1330-01), a 1/50 durante una noche a temperatura ambiente mediante un sistema amplificador Vectastain RTU Universal VECTOR de avidina/biotina, revelado en diaminobenzidina (DAB) con los núcleos contrateñidos con hemalun de Masson.

Con respecto al colágeno I, para los explantes no tratados (control N°0), en el décimo día, el marcaje es bastante claro y bastante denso en toda la dermis papilar.

20 En cuanto al colágeno III, para los explantes de control N°0, en el décimo día, el marcaje es débil a moderado y bastante regular en toda la dermis papilar.

Las observaciones, realizadas el J10 y con respecto al control N°0, concernientes a los explantes tratados se resumen en la tabla siguiente:

Explantos tratados	Observaciones
VitC-SQ según la invención al 3%	Ligera subexpresión del colágeno I Ligera sobreexpresión del colágeno III
Vitamina C libre al 3% (control N°1)	Sin sobreexpresión del colágeno I Sin sobreexpresión del colágeno III
VitC-palm al 3% (control N°2)	Sin sobreexpresión del colágeno I Sobreexpresión muy ligera del colágeno III

25 Primero, se observa una ausencia de efecto de la vitamina C «libre» a una dosis inferior o igual al 3% en peso, expresado en peso de vitamina C activa con respecto al peso total de la composición.

Solo el complejo según la invención manifiesta un efecto significativo a una dosis de 3% en peso con respecto al peso total de la composición.

30 En consecuencia, estos resultados revelan que la presencia del radical escualenoílo amplifica, en contra de cualquier expectativa, la eficacia de la vitamina C hasta las capas profundas de la piel puesto que se muestra eficaz a una concentración inferior a la concentración habitualmente requerida.

35 Para el conjunto de las pruebas realizadas a partir del 3% de materia activa, se observa un engrosamiento de la piel con una densificación bastante significativa del colágeno en la dermis papilar. Los GAGs neutros también se sobreexpresan de forma significativa a lo largo de la unión dermo-epidérmica y el colágeno III se sobreexpresa en detrimento del colágeno I.

Sin embargo, estos fenómenos se intensifican significativamente con el complejo según la invención.

Por tanto, se encuentra que a una dosis equivalente de vitamina C, los derivados VitC-SQ permiten una estimulación dérmica y epidérmica más importante que VitC-Palm.

5 Además, se ha encontrado una clara sobreexpresión de los GAGs neutros y una sobreexpresión del colágeno III en detrimento del colágeno I en comparación con las composiciones que comprenden VitC-Palm o la vitamina C «libre».

Por la presencia de una gran cantidad de GAGs, polisacáridos que tienen una fuerte capacidad de retención de agua, y de colágeno III en la piel, la morfología de ésta se encuentra mejorada. La piel aparece gruesa, de textura flexible, elástica, hidratada.

10 Por tanto, el complejo según la invención presenta una actividad antienvjecimiento superior al derivado comercial VitC-Palm.

Ejemplo 5: resultados sobre la toxicidad del complejo de VitC-SQ

Prueba de la viabilidad celular (prueba con MTT)

Se han sembrado 10 000 células de fibroblastos humanos CCD34SK por pocillo en la placa de 96 pocillos.

15 Los productos a probar se añaden a los pocillos en diferentes concentraciones. Después de 4 h de incubación, el medio de cultivo se reemplaza por un nuevo medio biológico y las células se incuban durante 48 h a 37°C bajo 5% de CO₂.

20 Después, el medio de cultivo se elimina por vuelco y se añaden 100 µL de PBS/pocillo con MTT a una concentración de 0,5 mg/ml. La placa se vuelve a colocar en la incubadora durante 2 h a 37°C bajo 5% de CO₂. Para disolver los cristales de formazán formados de color azul oscuro, se añaden 100 µL de una disolución de SDS (dodecilsulfato sódico) en cada pocillo, después la placa se vuelve a incubar durante 12 h a 37°C bajo 5 % de CO₂.

25 Al final de estas 12 h, las medidas espectrofotométricas se realizan en un lector de placas ELISA a la longitud de onda de 570 nm. Los porcentajes de viabilidad de las células en presencia de las moléculas a probar se calculan entonces por medio de la siguiente fórmula: (DO media de las células tratadas - DO de control de medio solo / DO media de las células control (100 % de viabilidad) - DO de control de medio solo) x 100 ± desviación estándar; o se presentan en forma de curvas que rastrean la evolución de la absorbancia en función del tiempo.

Las IC₅₀ ("concentración inhibidora del 50%", o sea, la concentración que inhibe el crecimiento del 50% de las células) corresponden entonces a la concentración del producto probado que genera una pérdida de 50% en la viabilidad celular (ver Tabla a continuación).

30 Tabla: IC₅₀ (µM). Actividad biológica *in vitro* de VitC-SQ, VitC y VitC-palm en líneas de fibroblastos humanos CCD34SK.

Producto probado	IC ₅₀ , µM
VitC-SQ	600
VitC-palm	250
VitC	ND

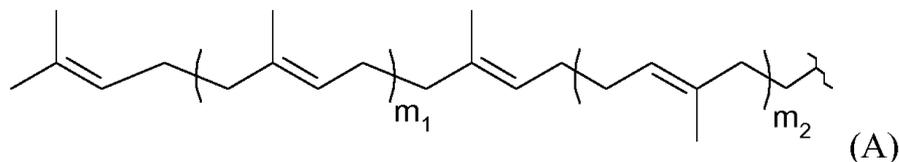
Resultados:

A partir de los resultados obtenidos, no se ha determinado la toxicidad de VitC. El VitC-SQ es la mitad de tóxico que el VitC-palm.

35

REIVINDICACIONES

1. Conjugado formado por al menos una molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona o derivado unido covalentemente a al menos un radical hidrocarbonado de la fórmula (A) siguiente:

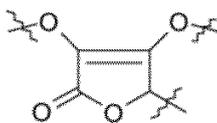


5 en la que:

- $m_1 = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ ó 6 ;
- $m_2 = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ ó 6 ; y
-



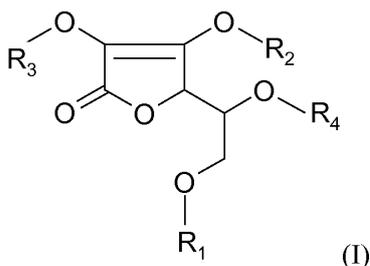
10 representa el sitio de enlace a la molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona o derivado que tiene un sistema 3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona como se esquematiza de la siguiente manera:



2. Conjugado según la reivindicación 1, en el que el compuesto hidrocarbonado comprende de 12 a 40 átomos de carbono, preferiblemente 18 a 30 átomos de carbono.

15 3. Conjugado según la reivindicación 1 ó 2, en el que el radical hidrocarbonado es el radical de fórmula (A) en el que m_1 representa 1 y m_2 representa 2, ó m_1 representa 0 y m_2 representa 0, ó m_1 representa 1 y m_2 representa 0.

4. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, de fórmula general (I)

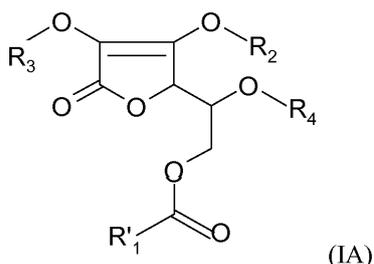


en la que:

20 R_1, R_2, R_3 y R_4 , idénticos o diferentes, representan independientemente uno de otro un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado de fórmula (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,

siendo al menos uno de los grupos R_1, R_2, R_3 y R_4 diferentes del átomo de hidrógeno.

5. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, de fórmula general (IA):



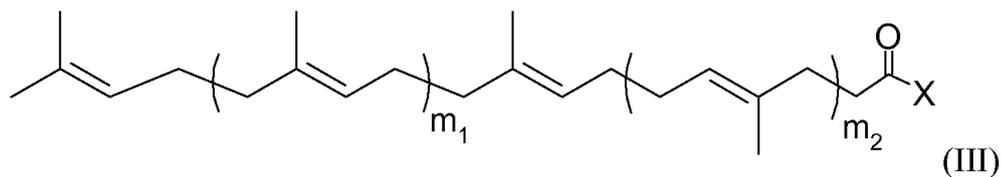
en la que:

5 R_2 , R_3 y R_4 , idénticos o diferentes, representan independientemente uno de otro un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado de fórmula (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y R'_1 representa un radical hidrocarbonado de fórmula (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

6. Conjugado según la reivindicación 5, en la que R_2 , R_3 y R_4 representan los tres un átomo de hidrógeno.

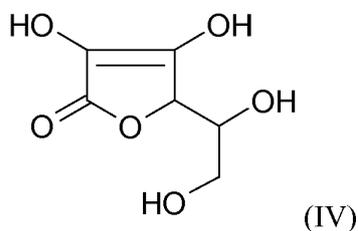
7. Procedimiento para la preparación del conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende:

la condensación de al menos una molécula de un haluro de acilo de fórmula (III)



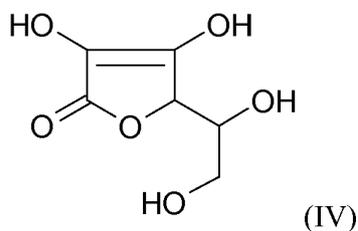
10 en la que X es un átomo de halógeno y preferiblemente un átomo de cloro, y m_1 y m_2 son como se han definido para el compuesto de fórmula (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,

y de al menos una molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona (IV)

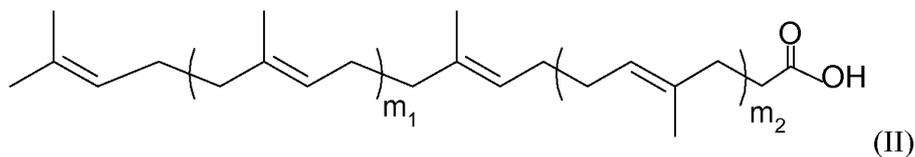


para obtener dicho conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

15 8. Procedimiento para la preparación de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende la reacción de esterificación entre al menos una molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona de fórmula (IV)



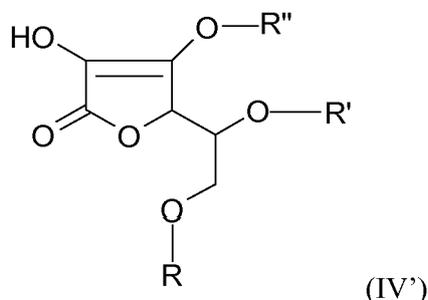
y al menos una molécula de un ácido de fórmula (II)



en la que m_1 y m_2 son como se han definido para el compuesto de fórmula (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

9. Procedimiento para la preparación del conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende:

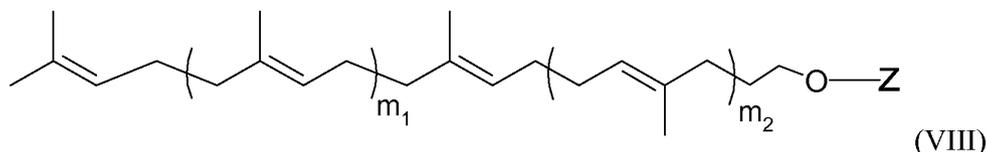
la reacción entre al menos una molécula de 5-(1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona de fórmula (IV')



5

en la que R, R' y R'' representan un átomo de hidrógeno o un grupo protector;

y al menos una molécula de un compuesto de fórmula (VIII)



10 en la que m_1 y m_2 son como se han definido para el compuesto de fórmula (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y Z es un átomo de hidrógeno o un grupo $-\text{SO}_2-\text{CH}_3$.

10. Nanopartículas de un conjugado tal como se ha definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

11. Nanopartículas según la reivindicación 10, caracterizadas por que poseen un tamaño medio que varía de 30 nm a 500 nm, en particular de 40 a 250 nm, incluso de 45 a 95 nm.

15 12. Procedimiento para la preparación de nanopartículas según la reivindicación 10 u 11, caracterizado por que comprende al menos:

- la dispersión de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en al menos un disolvente orgánico a una concentración suficiente para obtener, durante la adición de la mezcla correspondiente con agitación a una fase acuosa, la formación instantánea de nanopartículas en suspensión en dicha fase acuosa y, si fuera necesario,

20 - el aislamiento de dichas nanopartículas.

13. Composición cosmética, dermatológica o alimentaria que comprende como materia activa al menos un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o nanopartículas según la reivindicación 10 u 11 en asociación con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable.

25 14. Utilización cosmética de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o de nanopartículas según la reivindicación 10 u 11 para la prevención y/o tratamiento de los signos de envejecimiento de la piel del cuerpo y/o de la cara.

15. Utilización cosmética de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o de nanopartículas según la reivindicación 10 u 11 para estimular la síntesis de colágeno, en particular del colágeno III, y/o estimular la síntesis de glicosaminoglicanos.

30 16. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o nanopartículas según la reivindicación 10 u 11 para su utilización en medicina.

17. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o nanopartículas según la reivindicación 10 u 11 para su utilización en la prevención y/o tratamiento de quemaduras y/o heridas y/o cualquier otra patología relacionada con la cicatrización de la dermis y/o epidermis.

35 18. Procedimiento para el tratamiento cosmético de la piel del cuerpo y/o de la cara y/o del cuero cabelludo, en el que se administra una composición como se define en la reivindicación 13.