

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 412**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/02	(2006.01)	A61K 47/64	(2007.01)
A61Q 19/08	(2006.01)		
A61K 8/67	(2006.01)		
C07K 5/09	(2006.01)		
C07H 11/04	(2006.01)		
A61K 47/42	(2007.01)		
A61K 38/03	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 47/14	(2007.01)		
A61K 9/06	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2015 PCT/KR2015/011218**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16085127**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2015 E 15864076 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3225620**

54 Título: **Derivado estable de ácido ascórbico conjugado con péptido, método de preparación del mismo y composición cosmética que comprende el mismo**

30 Prioridad:

27.11.2014 KR 20140167350

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

17.06.2020

73 Titular/es:

**CELLTRION INC. (100.0%)
23 Academy-ro, Yeonsu-gu
Incheon 22014, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, YOUNG JUN;
KIM, JUNG YUN;
JEONG, JIN KYO;
KIM, HYEONG MI;
CHO, EUN JOO;
LIM, JOO HYUCK;
SONG, HYUN NAM;
PARK, SEON KYUNG;
MOON, WON KANG;
CHANG, SHIN JAE y
HONG, SEUNG SUH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 767 412 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

Derivado estable de ácido ascórbico conjugado con péptido, método de preparación del mismo y composición cosmética que comprende el mismo

5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un derivado estable de ácido ascórbico conjugado con péptido que presenta un excelente efecto de reducción de las arrugas y un excelente efecto de blanqueamiento, a un método de preparación del mismo y a una composición cosmética que comprende el mismo como principio activo.

[Antecedentes de la técnica]

15 En general, el ácido ascórbico actúa como un agente reductor, un promotor de la síntesis del colágeno o un antioxidante, estimula la absorción del hierro en el intestino delgado y participa en la biosíntesis y en la inmunidad de la carnitina. Se sabe que, cuando el organismo tiene deficiencia de ácido ascórbico, se pueden producir escorbuto, anomalías en el tejido conjuntivo causadas por las anomalías en la síntesis del colágeno, dolor de huesos, fractura ósea, diarrea, etc., y cuando existe una cantidad excesiva de ácido ascórbico en el organismo, se pueden producir trastornos gastrointestinales, incluyendo náuseas, dolor abdominal, diarrea y similares. En particular, se sabe que el excelente efecto antioxidante del ácido ascórbico inhibe la producción de melanina en la piel, evitando así pigmentaciones anómalas tales como las pecas y, por lo tanto, el ácido ascórbico está siendo foco de atención como material de uso externo en la piel.

25 Aunque el ácido ascórbico presenta diferentes efectos como se ha descrito anteriormente, tiene los problemas de se destruye principalmente cuando se calienta en el aire, es inestable contra los álcalis y se oxida fácilmente en una solución acuosa, perdiendo dichos efectos. Por lo tanto, para superar esta inestabilidad del ácido ascórbico, se han desarrollado diferentes derivados de ácido ascórbico.

30 Los derivados de ácido ascórbico que ya se han desarrollado son los siguientes. En primer lugar, existen derivados tales como el ácido ascórbico fosforilado o sus sales metálicas. Dichos derivados se convierten fácilmente en una forma de ácido L-ascórbico disponible en el cuerpo humano, en comparación con otros derivados, pero tiene la desventaja de que son difíciles de absorber en la piel, porque tienen cargas negativas. En segundo lugar, se conoce una variedad de derivados conjugados con ácidos grasos, incluyendo el palmitato de ascorbilo, el laurato de ascorbilo, el estearato de ascorbilo, etc. Entre estos derivados, el ascorbil-6-palmitato se usa más ampliamente (véase la patente de EE.UU. N.º 5.409.693). Estos compuestos derivados se absorben en la piel, pero tienen la desventaja de que son difíciles de convertir en una forma de ácido L-ascórbico. En tercer lugar, se conocen derivados de ácido ascórbico conjugados con péptidos productores de colágeno, en los que un grupo succinilo está unido al grupo hidroxilo en el carbono 5 o carbono 6 del ácido ascórbico por un enlace éster, y el péptido productor de colágeno está unido por un enlace amida (véase la patente coreana n.º KR 10-045967 9). Estos derivados muestran una excelente eficacia en comparación con el ácido ascórbico, pero tienen la desventaja de tener poca estabilidad.

45 Como se ha descrito anteriormente, casi todos los derivados de ácido ascórbico desarrollados hasta la fecha no mejoraron en términos de eficacia o estabilidad en comparación con el ácido ascórbico puro, y los derivados de ácido ascórbico conjugados con péptidos, en su mayoría, han tenido como objetivo mejorar solo el efecto de blanqueamiento del ácido ascórbico. Por lo tanto, el amplio uso de estos derivados para aplicaciones cosméticas es limitado.

[Divulgación]

50 [Problema técnico]

Por consiguiente, los presentes inventores han realizado grandes esfuerzos por desarrollar un derivado de ácido ascórbico que tenga tanto un efecto de reducción de las arrugas como un efecto de blanqueamiento, resolviendo a la vez los problemas de los derivados convencionales de ácido ascórbico. Como resultado de ello, Los presentes inventores han descubierto que, cuando se conjuga un compuesto peptídico que tiene de 2 a 5 unidades con un compuesto diéster de ácido aminopropanol-fosfórico de ácido ascórbico, se puede obtener un derivado estable de ácido ascórbico que tenga tanto un efecto de reducción de las arrugas como un efecto de blanqueamiento, completando de esta forma la presente invención.

60 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido representado por la siguiente fórmula I o una sal cosméticamente aceptable del mismo.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método de preparación de un derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido representado por la siguiente fórmula I o una sal cosméticamente aceptable del mismo.

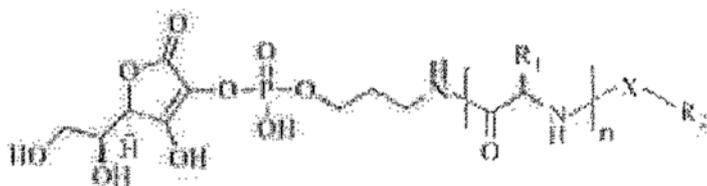
65 Es otro objeto más de la presente invención proporcionar una composición cosmética que comprenda, como principio activo, un derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido representado por la siguiente fórmula I o una sal

cosméticamente aceptable del mismo, y el uso del mismo para la reducción de las arrugas y el blanqueamiento de la piel.

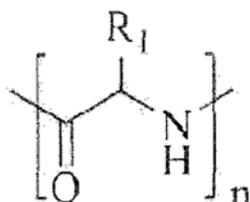
[Solución técnica]

5 La presente invención se dirige a un derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido representado por la siguiente fórmula I o una sal cosméticamente aceptable del mismo:

Fórmula I

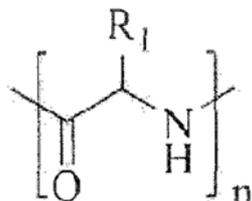


10 en donde

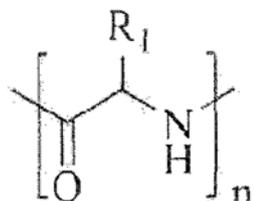


representa un péptido en el que los mismos o diferentes restos de aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácidos naturales o no naturales están unidos por enlaces amida; R₁ representa cadenas laterales de los restos de aminoácidos;

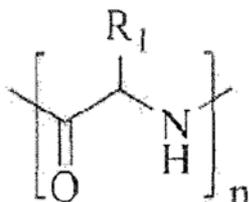
15 X es hidrógeno o carbonilo (C=O); R₂ es nulo cuando X es hidrógeno o R₂ es palmitilo, laurilo o estearilo cuando X es carbonilo; y n es un número entero que varía de 2 a 5.



20 Preferentemente, representa un péptido en el que los mismos o diferentes restos de aminoácidos seleccionados entre glicina, alanina, serina, treonina, cisteína, valina, leucina, isoleucina, prolina, hidroxiprolina, lisina, fenilalanina, metionina, tirosina, triptófano, asparagina, glutamina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico y arginina están unidos por enlaces amida; R₁ representa cadenas laterales de los restos de aminoácidos; y n es un número entero que varía de 3 a 5.



25 Más preferentemente, representa un péptido en el que los mismos o diferentes restos de aminoácidos seleccionados entre valina, lisina, glicina, arginina, ácido aspártico, treonina y serina están unidos por enlaces amida; R₁ representa cadenas laterales de los restos de aminoácidos; y n es un número entero que varía de 3 a 5.



Incluso más preferentemente, representa lisina-valina-lisina o arginina-glicina-ácido aspártico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácidos naturales" se refiere a los aminoácidos α seleccionados del grupo que consiste en alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácidos no naturales" se refiere a aminoácidos que no están codificados por un codón de ácido nucleico, y los ejemplos de los aminoácidos no naturales incluyen, pero sin limitación, isómeros D de los aminoácidos α naturales como se ha descrito anteriormente; Aib (ácido aminobutírico), bAib (ácido 3-aminoisobutírico), Nva (norvalina), β -Ala, Aad (ácido 2-aminoadípico), bAad (ácido 3-aminoadípico), Abu (ácido 2-aminobutírico), Gaba (ácido γ -aminobutírico), Acp (ácido 6-aminocaproico), Dbu (ácido 2,4-diaminobutírico), ácido α -aminopimélico, TMSA (trimetilsilil-Ala), able (aloisoleucina), Nle (norleucina), *terc*-Leu, Cit (citrulina), Orn, Dpm (ácido 2,2'-diaminopimélico), Dpr (ácido 2,3-diaminopropiónico), α - o β -Nal, Cha (ciclohexil-Ala), hidroxiprolina, Sar (sarcosina), etc.; aminoácidos cíclicos; aminoácidos N- α -alquilados, por ejemplo, MeGly (N α -metilglicina), EtGly (N α -etilglicina) y EtAsn (N α -etilasparagina); y aminoácidos que tienen dos sustituyentes de cadena lateral en el carbono α .

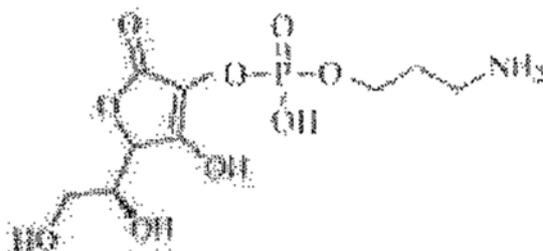
15 El derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en los siguientes compuestos:

20 (6S,9S,12S)-6,12-bis(4-aminobutil)-9-isopropil-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazonacosil (5-((S)-1,2-dihidroxietil)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)hidrogenofosfato (I-1); y ácido (3S)-3-(2-((S)-2-amino-5-((diaminometil)amino)pentanamido)acetamido)-4-((3-(((5-((S)-1,2-dihidroxietil)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)oxi)(hidroxil)fosforil)oxi)propil)amino)-4-oxobutanoico (I-2).

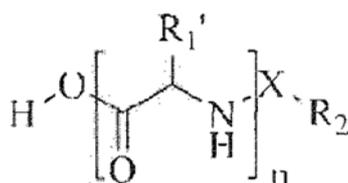
25 En la presente invención, Las "sales cosméticamente aceptables" incluyen, pero sin limitación, todas las sales de ácidos inorgánicos y de ácidos orgánicos no tóxicas, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, sales de ácido sulfúrico, sales de ácido nítrico, sales de ácido fosfórico, sales de ácido acético, sales de ácido trifluoroacético, sales de ácido benzenosulfónico, sales de ácido cítrico, etc.

30 La presente invención también se dirige a un método de preparación del derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido representado por la fórmula I. El método de preparación de la presente invención comprende una etapa de someter un compuesto diéster de ácido aminopropanol-fosfórico de ácido ascórbico de la siguiente fórmula II a una reacción de condensación con un compuesto peptídico de la siguiente fórmula IV con de 2 a 5 unidades, y luego someter el producto a una reacción de desprotección si hay un grupo protector en el producto:

35 Fórmula II



Fórmula IV



en donde



40 $\left[\text{H}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}_1')-\text{NH} \right]_n$ representa un péptido en el que los mismos o diferentes restos de aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácidos naturales o no naturales están unidos por enlaces amida;

R₁ representa cadenas laterales de los restos de aminoácidos;
 R₁' es igual a R₁ o es R₁ en el que el grupo amino o el grupo carboxilo está protegido;
 X es hidrógeno o carbonilo (C=O);
 R₂ es nulo cuando X es hidrógeno o R₂ es palmitilo, laurilo o estearilo cuando X es carbonilo; y
 n es un número entero que varía de 2 a 5.

Como grupo protector de amino del compuesto de fórmula IV, *t*-butoxicarbonilo (*t*-Boc), carbobenciloxi (Cbz), se puede usar 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o similar, pero sin limitación. Asimismo, la desprotección del grupo protector de amino del compuesto de fórmula IV puede realizarse usando ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético, pero sin limitación.

Como grupo protector de carboxilo del compuesto de fórmula IV, se puede usar metilo, etilo, *t*-butilo, 2,2,2-tricloroetilo o similares, pero sin limitación. Asimismo, la desprotección del grupo protector de carboxilo del compuesto de fórmula IV puede realizarse usando hidróxido de litio o ácido trifluoroacético, pero sin limitación.

La reacción de condensación se puede realizar en presencia de un agente de condensación. Los ejemplos del agente de condensación que se puede usar en la reacción de condensación incluyen, pero sin limitación, dicitohexilcarbodiimida (DCC), difenilfosforilazida (DPPA), dietil-cianofosfonato (DEPC), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamin)fosfonio (reactivo BOP) y similares. En la reacción de condensación, si es necesario, se puede usar una base orgánica tal como trietilamina o diisopropiletilamina (DIPEA), junto con el agente de condensación, y, si es necesario, se puede usar un activador tal como 4-(dimetilamin)piridina (DMAP) o *N*-hidroxisuccinimida (HOSu).

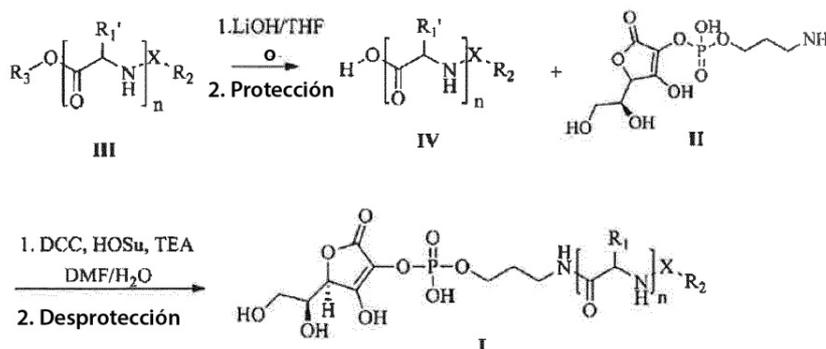
Los ejemplos de disolvente que se puede usar en la reacción de condensación incluyen hidrocarburos alifáticos halogenados tales como cloroformo y diclorometano, acetato de etilo, tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), acetonitrilo, 1,4-dioxano, metanol, etc. La reacción de condensación se puede realizar a una temperatura de -10 °C a 50 °C, preferentemente, de 0 °C a 25 °C.

El compuesto de fórmula II puede sintetizarse de acuerdo con un método conocido (véase *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003, Vol. 24, nº. 8, pág. 1169-1171), o ser un producto disponible en el mercado.

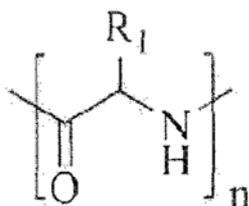
En el compuesto de fórmula IV, el péptido (donde R₂ es nulo) o el péptido de ácido graso (donde R₂ es palmitilo, laurilo o estearilo) puede ser un péptido sintetizado usando un método de síntesis en fase sólida o un péptido de ácido graso sintetizado mediante la polimerización del péptido sintetizado con un ácido graso, o puede ser un producto disponible en el mercado.

A partir de ahora en el presente documento, se describirá en detalle el método de preparación del derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido de fórmula I de acuerdo con la presente invención con referencia al siguiente esquema de reacción I. El método que se muestra en el siguiente esquema de reacción I es meramente representativo de los posibles métodos de preparación, y el orden de las operaciones unitarias, reactivos, condiciones de reacción, etc., que se muestra en el siguiente esquema de reacción I, puede modificarse adecuadamente, si es necesario.

Esquema de reacción I



45 en donde



representa un péptido en el que los mismos o diferentes restos de aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácidos naturales o no naturales están unidos por enlaces amida;

R₁ representa cadenas laterales de los restos de aminoácidos;

R₁' es igual a R₁ o es R₁ en el que el grupo amino o el grupo carboxilo está protegido;

5 X es hidrógeno o carbonilo (C=O);

R₂ es nulo cuando X es hidrógeno o R₂ es palmitilo, laurilo o estearilo cuando X es carbonilo;

R₃ es hidrógeno, metilo, etilo, *t*-butilo o 2,2,2-tricloroetilo; y

n es un número entero que varía de 2 a 5.

10 El método de preparación de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de;

(i) bien proteger el compuesto de fórmula III con un grupo protector de amino tal como *t*-butoxicarbonilo (*t*-Boc) y un grupo protector de carboxilo tal como *t*-butilo, obteniéndose un compuesto de fórmula IV en el que el grupo amino y el grupo carboxilo están protegidos, o desproteger el grupo carboxilo C-terminal del compuesto de fórmula III con una base tal como hidróxido de litio, obteniéndose un compuesto de fórmula IV; y

15 (ii) someter el compuesto de fórmula IV a una reacción de condensación con el compuesto de fórmula II ((5-((*S*)-1,2-dihidroxiethyl)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)hidrogenofosfato de 3-aminopropilo) en presencia de un agente de condensación tal como dicitclohexilcarbodiimida (DCC), y desproteger el grupo amino y el grupo carboxilo de la cadena lateral de aminoácidos con ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético, obteniéndose de este modo el compuesto de fórmula I.

20 Si el compuesto de fórmula III no necesita ser sometido a la etapa de protección o desprotección (i) del método de preparación, el compuesto de fórmula I puede sintetizarse realizando la etapa (ii) sin realizar la etapa (i).

25 El derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido de la presente invención, preparado de acuerdo con el método descrito anteriormente, es estable y también presenta tanto un excelente efecto de reducción de las arrugas como un excelente efecto de blanqueamiento (véanse los ejemplos experimentales 1, 2 y 3 que figuran a continuación).

30 La presente invención también se dirige a una composición cosmética, que comprende: el derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido de fórmula I o una sal cosméticamente aceptable del mismo; y una base cosméticamente aceptable. La composición cosmética de la presente invención tiene, en particular, un efecto de reducción de las arrugas de la piel y un efecto de blanqueamiento de la piel.

35 La composición cosmética de la presente invención comprende, basándose en el peso total de la composición cosmética, 0,0001-2 % en peso, preferentemente, 0,01-0,20 % en peso del compuesto de fórmula I como principio activo.

40 La formulación de la composición cosmética de acuerdo con la presente invención no se limita a una en particular, y la composición cosmética de la presente invención puede comprender los componentes de las composiciones cosméticas convencionales conocidos en la técnica dependiendo de la formulación que se vaya a preparar. La composición cosmética de la presente invención puede prepararse en forma de formulaciones tales como loción, emulsión, crema nutritiva, envase, líquido de belleza, esencia o similar, y puede comprender además uno o más componentes seleccionados entre aceite, agua, tensioactivos, agentes hidratantes, alcoholes inferiores, espesantes, agentes quelantes, pigmentos, conservantes, fragancias y similares, dependiendo de la formulación que se vaya a preparar. Asimismo, en vista del hecho de que la principal causa de la formación de melanina son los rayos UV, la composición cosmética de la presente invención puede comprender un agente bloqueante de la radiación UV, un agente dispersante de la luz o similar. Sin embargo, la formulación y los componentes de la composición cosmética no se limitan a los contenidos descritos anteriormente.

50 [Efectos ventajosos]

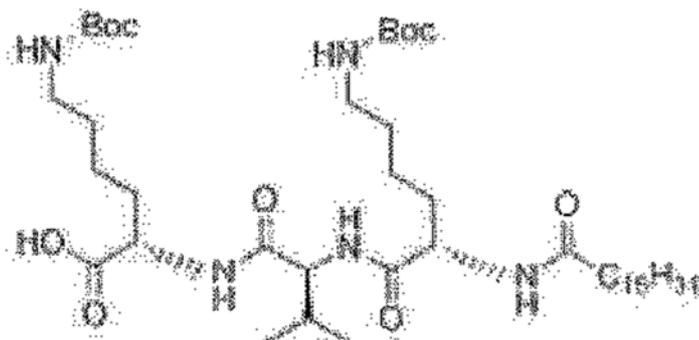
55 El derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido de acuerdo con la presente invención es un nuevo compuesto sintético, y presenta tanto el efecto de blanqueamiento de la piel al inhibir la formación de melanina como el efecto de reducción de las arrugas de la piel al activar la producción de colágeno, de ese modo, puede usarse ventajosamente en composiciones cosméticas.

[Modo para la invención]

A partir de ahora en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos y ejemplos de preparación. Será evidente para los expertos en la materia que estos ejemplos y ejemplos de preparación son solo para fines ilustrativos y que no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

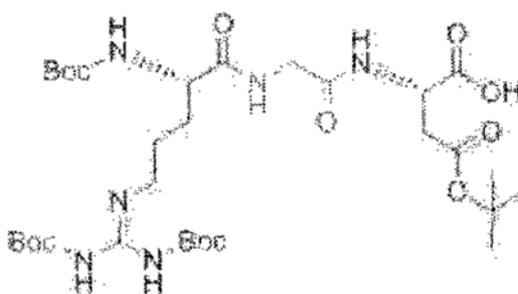
- 5 **Ejemplo de preparación 1:** Preparación del compuesto de fórmula IV en el que se protegen el grupo amino (-NH₂) y el grupo carboxilo (-COOH)

Ejemplo de preparación 1-1: (10S,13S,16S)-16-(4-((*t*-butoxicarbonil)amino)butil)-13-isopropil-2,2-dimetil-4,11,14-trioxo-10-palmitamido-3-oxa-5,12,15-triazaheptadecan-17-oato (IV-1)



- 10 Se disolvió tripéptido 5 de palmitoilo (Pal-KVK) (30,6 g, 50 mmol) en 100 ml de metanol y 50 ml de trietilamina. Se enfrió la solución de reacción hasta 0 °C, y se añadió dicarbonato de di-*t*-butilo (29 ml, 125 mmol) a la misma, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. Una vez completada la reacción, se concentró la solución de reacción a presión reducida para retirar el disolvente, y se añadió una solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio (150 ml) al residuo, que luego se lavó dos veces con éter dietílico (150 ml). La capa acuosa se ajustó a pH 2 mediante la adición de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio 1 M (200 ml) y se extrajo tres veces con acetato de etilo (300 ml), y la capa orgánica se lavó secuencialmente con agua destilada (300 ml) y una solución acuosa saturada de cloruro sódico (300 ml), y después se secó con sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida, proporcionando el compuesto del título (34 g, 84 %).
- 15 ES-MS *m/z*: 812 [M+H]⁺
 RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,89 (m, 3 H), 0,97 (m, 6 H), 1,28-1,43 (m, 48 H), 1,59-1,99 (m, 8 H), 2,06 (m, 1H), 2,24 (t a, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,02 (m, 4 H), 4,20 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,37 (m, 2 H).

- 20 **Ejemplo de preparación 1-2:** (11S,17S)-17-(2-(*t*-butoxi)-2-oxoetil)-6,11-bis((*t*-butoxicarbonil)amino)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,7,13,16-tetrazaoctado-6-cen-18-oato (IV-2)



- 30 Se disolvieron *N*-carbobenzoxiglicina (Z-Gly-OH) (11,48 g, 54,8 mmol) y clorhidrato de 4-*t*-butil-1-metiléster de ácido L-aspártico (13,14 g, 54,8 mmol) en tetrahidrofurano (275 ml), y se enfrió hasta 0 °C. A la solución de reacción, se añadieron hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) (8,90 g, 65,8 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC·HCl) (11,31 g, 65,8 mmol), y se añadió trietilamina (23,1 ml, 164,6 mmol) gota a gota. Se agitó la solución de reacción a 0 °C durante 30 minutos, y después se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Una vez completada la reacción, se añadió agua (200 ml) a la mezcla de solución de reacción que luego se lavó tres veces con acetato de etilo (100 ml). A continuación, se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro sódico (200 ml), se secaron con sulfato sódico anhidro, y luego se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna, proporcionando 1-metil-2-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)acetamido)succinato (S)-4-*t*-butílico (16,0 g, 74 %).
- 35 ES-MS *m/z*: 395 [M+H]⁺, 417 [M+Na]⁺
 RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,41 (s, 9H), 2,68-2,83 (m, 2 H), 3,61 (m, 3 H), 3,62 (m, 3 H), 3,62-3,64 (m, 2 H),
- 40

ES 2 767 412 T3

4,64-4,69 (m, 1H), 5,03 (m, 2 H), 7,31-7,39 (m, 5 H), 7,46 (t, 1H), 8,35 (d, 1H).

Se disolvió el compuesto obtenido (16,0 g, 40,57 mmol) en metanol (200 ml) y, a ello, se añadió carbono sobre paladio al 10 % (2,02 g), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas en una atmósfera de hidrógeno. Una vez completada la reacción, se filtró la mezcla de reacción a través de Celite, se lavó varias veces con metanol y luego se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente, obteniéndose así 1-metil-2-(2-aminoacetamido)succinato (S)-4-*t*-butílico (8,04 g, 91 %) en forma de un sólido de color blanco.

ES-MS *m/z*: 261 [M+H]⁺, 283 [M+Na]⁺

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,41 (s, 9H), 2,64-2,78 (m, 2 H), 3,47 (m, 3 H), 3,62 (m, 3 H), 3,65-3,77 (m, 2 H), 4,10-4,12 (m, 1H), 8,10 (s, 1H).

Se disolvieron 1-metil-2-(2-aminoacetamido)succinato (S)-4-*t*-butílico (8,04 g, 30,89 mmol) y *N*₆Boc-*N*₆Cbz-L-ornitina (13,5 g, 38,8 mmol) en tetrahidrofurano (185 ml) y se enfrió hasta 0 °C. A la solución de reacción, se añadieron hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (5,98 g, 44,2 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC·HCl) (7,6 g, 44,2 mmol), y se añadió trietilamina (11,39 ml, 84,1 mmol) gota a gota. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 minutos, y después se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Una vez completada la reacción, se añadió agua (150 ml) a la mezcla de solución de reacción, que luego se lavó dos veces con acetato de etilo (100 ml), se secó con sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna, proporcionando 1-metil-2-(2-((S)-5-((benciloxi)carbonil)amino)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)pentamido)acetamido)succinato (S)-4-*t*-butílico (9,76 g, 47 %) en forma de un sólido de color blanco.

ES/EM *m/z*: 609 [M+H]⁺, 631 [M+Na]⁺

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,44 (s, 18 H), 1,58-1,66 (m, 4H), 1,82-1,92 (m, 1H), 2,81-2,87 (m, 1H), 2,96-3,01 (m, 1H), 3,15-3,39 (m, 2 H), 3,67 (m, 3 H), 3,72 (m, 3 H), 3,94 (m, 2 H), 4,25 (m, 1H), 4,83 (m, 1H), 5,08 (m, 2 H), 5,13 (m, 2 H), 7,00 (m, 2 H), 7,32-7,35 (m, 5 H).

Se disolvió el compuesto obtenido (9,76 g, 17,2 mmol) en metanol (85 ml) y, a ello, se añadió carbono sobre paladio al 10 % (0,86 g), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas en una atmósfera de hidrógeno. Una vez completada la reacción, se filtró la mezcla de reacción a través de Celite, se lavó varias veces con metanol y luego se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente, obteniéndose así 1-metil-2-(2-((S)-5-amino-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)pentamido)acetamido)succinato (S)-4-*t*-butílico (7,45 g, 99 %) en forma de un sólido de color blanco.

ES-MS *m/z*: 475 [M+H]⁺, 497 [M+Na]⁺

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,44 (s, 18H), 1,52-1,61 (m, 2H), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,76-1,87 (m, 1H), 2,20 (d a, 4 H), 2,75 (m, 1H), 2,79-2,85 (m, 1H), 2,98-3,03 (m, 1H), 3,69 (m, 3 H), 3,75 (m, 3 H), 3,94 (m, 2 H), 4,20 (m, 1H), 4,85 (m, 1H), 5,84 (m, 1H), 7,16 (m, 1H), 7,54 (m, 1H).

Se disolvió 1-metil-2-(2-((S)-5-amino-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)pentamido)acetamido)succinato (S)-4-*t*-butílico (7,45 g, 17,2 mmol) en diclorometano (85 ml) y, a ello, se añadieron 1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonil)guanidina (7,08 g, 18,1 mmol) y trietilamina (2,5 ml, 18,1 mmol), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 16 horas. Una vez completada la reacción, se añadió agua (85 ml) a la mezcla de solución de reacción, que luego se lavó dos veces con diclorometano (50 ml), se secó con sulfato sódico anhidro y después se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna, proporcionando 1-metil-2-((S)-6,11-bis((*t*-butoxicarbonil)amino)-2,2-dimetil-4,12-dioxo-3-oxa-5,7,13-triazapentado-6-cenamido)succinato (S)-4-*t*-butílico (11,43 g, 98 %) en forma de un sólido de color blanco.

ES-MS *m/z*: 718 [M+H]⁺, 740 [M+Na]⁺

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,44 (s, 18 H), 1,48 (s, 18 H), 1,64-1,72 (s, 4 H), 1,87 (m, 1H), 2,81-2,86 (m, 1H), 2,96-3,01 (m, 1H), 3,30 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 3,68 (m, 3 H), 3,74 (m, 3 H), 3,96 (m, 2 H), 4,24 (m, 1H), 4,85 (m, 1H), 5,54 (m, 1H), 7,04 (m, 1H), 7,10 (m, 1H), 8,41 (m, 1H), 11,43 (m, 1H).

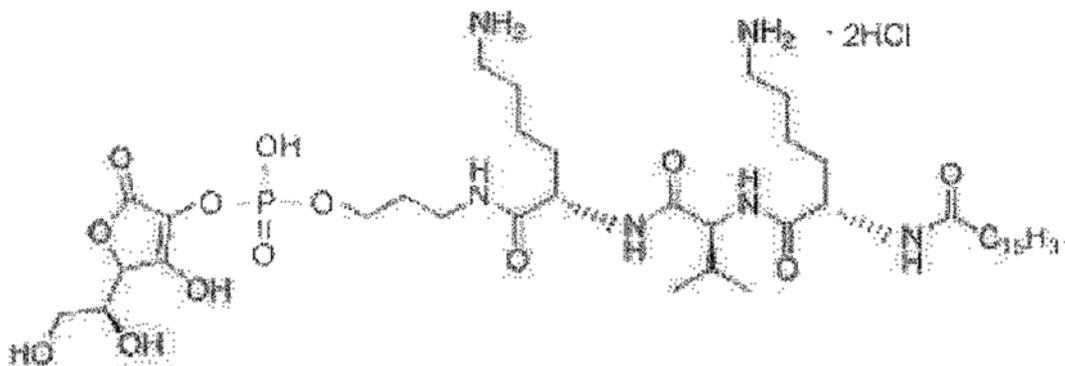
Se disolvió 1-metil-2-((S)-6,11-bis((*t*-butoxicarbonil)amino)-2,2-dimetil-4,12-dioxo-3-oxa-5,7,13-triazapentado-6-cenamido)succinato de (S)-4-*t*-butílico (11,43 g, 16,9 mmol) en tetrahidrofurano (127 ml) y se enfrió hasta 0 °C, y, a ello, se añadió solución de hidróxido de litio 1 M (45 ml), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 16 horas. Una vez completada la reacción, se enfrió la solución de reacción hasta 0 °C, se ajustó a pH 2 mediante la solución acuosa de HCl 1 M, y se extrajo dos veces con acetato de etilo (80 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro sódico (100 ml), se secaron con sulfato sódico anhidro y luego se concentraron a presión reducida, obteniéndose así el compuesto del título (8,96 g, 82 %) en forma de un sólido de color blanco.

ES-MS m/z : 703 $[M+H]^+$, 725 $[M+Na]^+$

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,28 (t, 1H), 1,42 (s, 18 H), 1,48 (s, 9 H), 1,49 (s, 9 H), 1,62-1,65 (m, 3 H), 1,85 (m, 1H), 2,81-2,85 (m, 1H), 2,99-3,04 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 4,13 (m, 1H), 4,76 (m, 1H), 5,24 (m, 1H), 5,85 (m, 1H), 5,82 (m, 1H), 7,71 (m, 2 H), 8,67 (m, 1H).

Ejemplos: Preparación del compuesto de Fórmula I

10 **Ejemplo 1: Clorhidrato de (6S,9S,12S)-6,12-bis(4-aminobutil)-9-isopropil-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazanonacosil-5-((S)-1,2-dihidroxietil)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)hidrogenofosfato (I-1)**



Se disolvió el compuesto IV-1 en el que está protegido el grupo amino (31,2 g, 38,4 mmol) obtenido en el Ejemplo de preparación 1-1 en dimetilformamida (250 ml), y, a ello, se añadieron *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (9,5 g, 46,1 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (5,3 g, 46,1 mmol), tras lo que se sometió la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de la reacción, se retiró la *N,N*-diciclohexilurea producida en forma de un subproducto por filtración a presión reducida. Al filtrado restante, se añadieron 3-aminopropil(5-((*S*)-1,2-dihidroxietil)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)hidrogenofosfato (Vitagen, 13,2 g, 42,2 mmol) de fórmula II y diisopropiletilamina (13,5 ml, 77 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Una vez completada la reacción, se concentró la solución de reacción a presión reducida para retirar el disolvente. Se recristalizó el residuo mediante la adición secuencial de MeOH, diclorometano y éter isopropílico, y se filtró, obteniéndose un compuesto (47 g, 112 %) de fórmula I-1, en la que el grupo amino está protegido.

ES-MS m/z : 1107 $[M+H]^+$

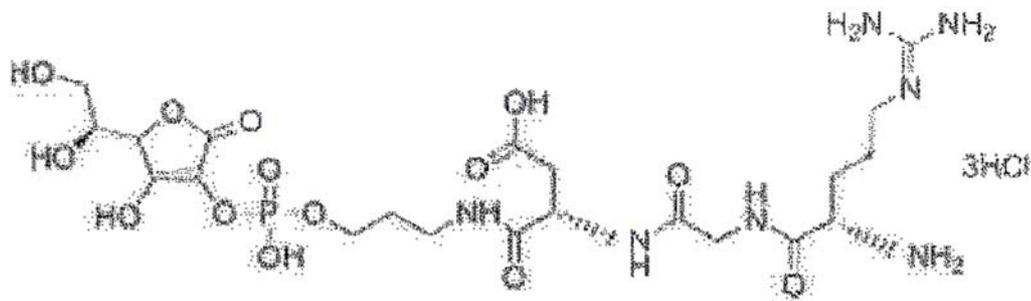
RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD) δ 0,96 (m, 3 H), 1,01 (m, 6 H), 1,35-1,55 (m, 48 H), 1,65-1,88 (m, 10 H), 2,14 (m, 1H), 2,30 (t a, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,09 (m, 4 H), 3,28 (m, 2 H), 3,73-3,82 (m, 3 H), 4,00 (m, 1H), 4,06 (m, 2 H), 4,22 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 4,37 (m, 2 H), 4,86-5,01 (m, 1H).

Se disolvió el compuesto obtenido (47 g, 37,9 mmol) de fórmula I-1, en el que está protegido el grupo amino en 1,4-dioxano (160 ml), y, a ello, se añadió ácido clorhídrico 4 M en solución de 1,4-dioxano (110 ml, 440 mmol), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 15 horas. Una vez completada la reacción, se concentró la solución de reacción a presión reducida para retirar el disolvente. Se añadió acetonitrilo (600 ml) al residuo, y se filtró el sólido formado, proporcionando el compuesto del título (33,0 g, 89 %).

ES-MS m/z : 907 $[M+H]^+$

RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD) δ 0,90 (m, 3 H), 0,92 (d, $J = 6,4$ Hz, 6 H), 1,28-1,39 (m, 26 H), 1,44-1,88 (m, 14 H), 2,12 (m, 1H), 2,25 (t a, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,96 (m, 4 H), 3,24-3,35 (m, 2 H), 3,68 (m, 3 H), 3,95-3,99 (td, $J = 1,6; 6,8$ Hz, 1H), 4,08-4,15 (m, 3 H), 4,29 (m, 1H), 4,37 (m, 1H), 4,93 (m, 1H).

Ejemplo 2: Clorhidrato de (3S)-3-(2-((S)-2-amino-5-((diaminometil)amino)pentanamido)acetamido)-4-((3-(((5-((S)-1,2-dihidroxietil)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)oxi)(hidroxil)fosforil)oxi)propil)amino)-4-oxobutanoato (I-2)



Se disolvió el compuesto IV-2 (2,46 g, 3,5 mmol) en el que el grupo amino y el grupo carboxilo están protegidos, obtenido en el Ejemplo de preparación 1-2 en dimetilformamida (20 ml), y, a ello, se añadieron *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,72 g, 3,5 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (0,4 g, 3,5 mmol), tras lo que se sometió la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción, se retiró la *N,N'*-diciclohexilurea producida en forma de un subproducto por filtración a presión reducida. Al filtrado resultante, se añadieron 3-aminopropil(5-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)hidrogenofosfato (Vitagen, 1,32 g, 4,2 mmol) de fórmula II y diisopropiletilamina (1,22 ml, 7,0 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez completada la reacción, se concentró la solución de reacción a presión reducida para retirar el disolvente. Se recristalizó el residuo mediante la adición secuencial de metanol, diclorometano y éter isopropílico, y se filtró, obteniéndose el compuesto 6,11-bis((*t*-butoxicarbonil)amino)-17-(((5-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)oxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propil)carbamoyl)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,7,13,16-tetraazanonado-6-cen-19-oato (11*S*,17*S*)-*t*-butílico de fórmula I-2 (3,28 g, 94 %) en el que el grupo amino y el grupo carboxilo están protegidos.

ES-MS *m/z*: 999 [M+H]⁺

Se disolvió el compuesto (3,28 g, 3,29 mmol) de fórmula I-2, en el que están protegidos el grupo amino y el grupo carboxilo en 1,4-dioxano (35 ml), y, a ello, se añadió ácido clorhídrico 4 M en solución de 1,4-dioxano (8,3 ml, 33 mmol), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 15 horas. Una vez completada la reacción, se concentró la solución de reacción a presión reducida para eliminar el disolvente, y el residuo se recristalizó mediante la adición secuencial de acetonitrilo, diclorometano y éter isopropílico, y se filtró, obteniéndose el compuesto del título (2,25 g, 91 %).

ES-MS *m/z*: 642 [M+H]⁺

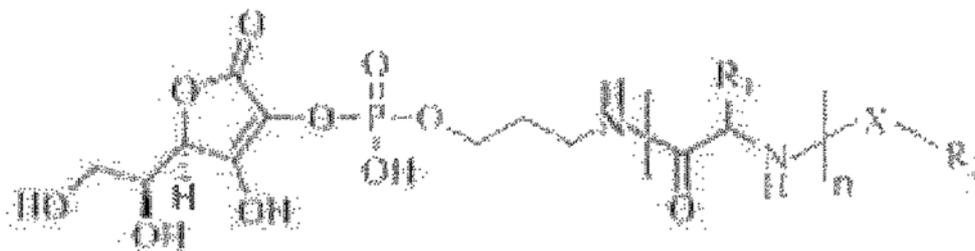
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,28 (t, 1H), 1,62-1,65 (m, 3 H), 1,85 (m, 1H), 1,91 (m, 2H), 2,81-2,85 (m, 1H), 2,99-3,04 (m, 1H), 3,17 (m, 2H), 3,20 (m, 2H), 3,40 (m, 1H), 3,45 (m, 2H), 3,63 (s, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,91 (m, 1H), 4,13 (m, 1H), 4,76 (m, 1H), 5,24 (m, 1H), 5,85 (m, 1H), 5,82 (m, 1H), 7,71 (m, 2 H), 8,67 (m, 1H).

30 Ejemplo experimental 1: Análisis del efecto inhibitor de melanina

Se añadieron estirpes celulares de melanoma B16F1 (ATCC CRL-6323) a un medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, y se cultivaron en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. Tras el cultivo, se reemplazó el medio por medio DMEM (Invitrogen-Gibco-BRL, células/pocillo), y se trató con una cantidad adecuada de una solución de muestra de manera que la concentración final de cada compuesto de ensayo alcanzara 0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml o 40 µg/ml. Tras 72 horas, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS (solución salina tamponada con fosfato), se recogió y se secó a 60 °C. A continuación, se añadió una solución de extracción de melanina (NaOH 1 N + DMSO al 10 %) a las células que luego se lisaron a 80 °C. A continuación, se cuantificó la cantidad de melanina usando melanina sintética como patrón, y se cuantificó la cantidad de proteína. Se calculó la cantidad de melanina por unidad de proteína, y se expresó como el % del valor de control en relación con un control.

Los resultados se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1



Ejemplo experimental 2: Análisis del efecto sobre la activación del colágeno

- 5 Se sembraron células de fibroblastos dérmicos neonatales humanos (Cascade Co.) en una microplaca de 24 pocillos (5 x 10⁴ células/pocillo) con medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, y se cultivaron en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 24 horas. Se reemplazó el medio por medio DMEM libre de suero, y las células se cultivaron durante 24 horas, y se trataron con cada solución de muestra de manera que la concentración final de cada compuesto de ensayo alcanzara 1 µg/ml o 5 µg/ml. Tras 48 horas de cultivo, se recogió el medio de cultivo celular y se midió la cantidad de procolágeno del medio usando un kit de medición de colágeno (Takara Shuzo Co., Ltd., Japón). En concreto, se añadió el medio de cultivo celular recogido a una placa de 96 pocillos que tenía un anticuerpo de colágeno primario aplicado uniformemente en la misma, y se sometió a una reacción antígeno-anticuerpo a 37 °C durante 3 horas. Se retiró el medio de cultivo celular de cada pocillo que luego se lavó cuatro veces con PBS. Se añadió una sustancia de desarrollo del color a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, y luego se añadió solución de ácido sulfúrico 1 N a cada pocillo para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro. Se preparó una curva patrón usando una solución patrón, y se sustituyó la absorbancia obtenida como se ha descrito anteriormente en la curva patrón para determinar de ese modo la producción de procolágeno en el medio de cultivo celular en el que se añadió cada compuesto de ensayo.
- 20 Los resultados se muestran en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2

Compuestos de ensayo	Concentración (µg/ml)	Procolágeno (ng/ml)				
		Promedio	DESVIACIÓN TÍPICA	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3
Control	-	193,9	13,6	184,1	188,2	209,5
KVK-Pal	1	244,4	17,9	248,9	259,7	224,7
	5	283,6	11,0	273,9	295,5	281,3
LAAP	1	242,3	10,1	231,4	251,3	244,1
	5	281,1	16,1	268,1	276,1	299,1
Compuesto I-1	1	277,7	13,1	278,1	264,4	290,6
	5	345,7	5,9	352,4	342,1	342,5
Compuesto I-2	1	253,1	9,7	252,4	243,8	263,1
	5	302,7	5,3	298,1	301,6	308,5

25 Ejemplo experimental 3: Prueba de estabilidad contra el agua y el calor

- La estabilidad de un principio activo, que se usa en composiciones cosméticas, tras aplicar agua y calor, es un factor importante no solo en un proceso de preparación, sino también en el almacenamiento a largo plazo de la composición. Por lo tanto, se midieron las estabilidades de los compuestos I-1 e I-2, preparados en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente, contra el agua y el calor. En concreto, se almacenó cada uno de los compuestos I-1 e I-2 en un estado sellado en condiciones duras de temperatura a 40 °C y humedad relativa del 75 %, y se analizó el porcentaje del principio activo de cada muestra tras 3, 7, 14 y 28 días en relación con el valor inicial del valor activo del principio activo en el día 0 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

- 35 Los resultados se muestran en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3

compuesto (sal)	Día/s				
	0 días	3 días	7 días	14 días	28 días
LAAP (Vitagen)	100	100,4	100,9	99,9	98,5
Compuesto I-1	100	101,0	100,4	99,9	99,8
Compuesto I-2	100	100,3	100,0	99,8	99,8

5 Como se puede ver en la Tabla 3 anterior, cada uno de los compuestos I-1 e I-2 se probó en condiciones duras durante 28 días y, como resultado de ello, se pudo ver que los compuestos presentaron una excelente estabilidad comparable a la de LAAP (Vitagen) disponible en el mercado.

Ejemplo experimental 4: Efecto inhibitorio contra la actividad de la ADN metiltransferasa (DNMT)

10 Para examinar el mecanismo del efecto del compuesto I-1 en la potenciación de la síntesis de procolágeno, se examinó el efecto inhibitorio del compuesto contra la actividad de DNMT usando un extracto nuclear aislado de células Hela y un kit de ensayo de detección de inhibidores/actividad de ADN metiltransferasa. A una tira recubierta con ADN rico en citosina, se añadieron un extracto nuclear de células Hela que comprendía DNMT, compuesto I-1 y Adomet. Como control positivo, se usó 5-aza-2'-desoxicitidina (5-azadC). Se añadieron secuencialmente a la tira un anticuerpo de captura, que se une al ADN metilado, y un anticuerpo de detección, tras lo que se añadió una solución de desarrollo para inducir una reacción de desarrollo del color, y luego se añadió una solución de detención para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm, y basándose en la absorbancia medida, se calculó el porcentaje de inhibición de la actividad de DNMT usando la siguiente ecuación 1. Los resultados del cálculo se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Ecuación 1

$$\% \text{ de inhibición} = [1 - (DO_{\text{inhibidor}} - DO_{\text{blanco}}) / (DO_{\text{control}} - DO_{\text{blanco}})] \times 100$$

25 Tabla 4

Compuestos de ensayo	Conc. (µg/ml)	% de inhibición							
		Promedio	DESVIACIÓN TÍPICA	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4	Ej. 5	Ej. 6
5-azadC	0,5	78 %	16 %	88 %	91 %	60 %	57 %	88 %	85 %
Compuesto I-1	1	40 %	10 %	48 %	48 %	34 %	23 %	40 %	45 %
	5	52 %	9 %	62 %	60 %	38 %	49 %	52 %	49 %
	10	70 %	7 %	79 %	79 %	66 %	62 %	65 %	68 %

30 Como se puede ver en la Tabla 4 anterior, el compuesto I-1 inhibió la metilación del ADN en un 50 % o más a una concentración de 5 µg/ml o superior, y presentó el efecto de inhibición de la metilación del ADN de una manera dependiente de la concentración en el intervalo de concentración de 1-10 µg/ml. Por lo tanto, se puede ver que el compuesto I-1 tiene el efecto de aumentar el nivel de procolágeno mediante la inhibición de la metilación del gen de colágeno.

Ejemplos de formulación: Composiciones cosméticas que comprenden derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido

35 Basándose en los ejemplos experimentales anteriores, se prepararon composiciones cosméticas que comprendían el derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido de acuerdo con el ejemplo de la presente invención de acuerdo con las composiciones mostradas en las tablas que figuran a continuación. Los siguientes ejemplos de formulación son para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo de formulación 1: Preparación de suavizante para la piel

45 De acuerdo con la composición que se muestra en la siguiente Tabla 5, se preparó un suavizante para la piel que comprendía el derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido de acuerdo con el ejemplo.

Tabla 5

Fases	Componentes	Contenido (%)
Fase acuosa	Agua purificada	Hasta 100
	Componente humectante	10-25
	Espesante	c.s.
	Agente secuestrante de iones metálicos	c.s.
Fase solubilizada	aceite de ricino hidrogenado de PEG-60	0-2
	aceite de ricino hidrogenado de PEG-40	0-2
	Alcohol polihídrico	0-10
	Fragancia	c.s.
	Etanol	0-20
Fase adicional I	Dipropilenglicol	0,23
	Glicerina	0,02
	Esterol de <i>Brassica campestris</i>	0,05
	Esterol de semilla de colza de PEG-5	0,05
	Colesterol	0,05
	Ceteth-3	0,03
	Ceteth-5	0,03
	1,2-hexanodiol	0,05
	Lecitina hidrogenada	0,05
	Estearoil-glutamato de sodio	0,02
	EDTA de disodio	0,01
	Octil-dodecanol	0,25
	Agua purificada	1,56
	Derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido	0,10
Fase adicional II	Conservante	c.s.
	Otros aditivos	c.s.

Método de preparación

- 5
- (1) Se mezclaron cada una de entre la fase acuosa y la fase solubilizada y se disolvieron uniformemente.
- (2) Se añadió la fase solubilizada a la fase acuosa, y se mezclaron, obteniéndose una emulsión de tipo aceite en agua.
- 10 (3) Entonces, se añadió la fase I adicional solubilizada en una fase que comprendía el derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido disuelto en la misma, y se mezcló con la emulsión, y luego se añadió la fase II adicional y se mezcló con la emulsión.

Ejemplo de formulación 2: Preparación de la loción

15 De acuerdo con la composición que se muestra en la siguiente Tabla 6, se preparó una loción que comprendía el derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido de acuerdo con el ejemplo.

Tabla 6

20

Fases	Componentes	Contenido (%)
Fase acuosa	Agua purificada	Hasta 100
	Olivato de Cetareth-6	0,1-3
	Componente humectante	10-25
	Espesante	c.s.
	Agente secuestrante de iones metálicos	c.s.
Fase oleosa	Estearato de PEG-100	0,1-1
	Estearato de glicerilo	0,1-1
	Polisorbato 60	0,1-1
	Alcohol cetílico	0,1-1
	Alcohol behenílico	0,1-1
	Escualano	5-20
Fase adicional I	Acetato de tocoferilo	0,1-0,5
	Dipropilenglicol	0,23
	Glicerina	0,02
	Esterol de <i>Brassica campestris</i>	0,05

ES 2 767 412 T3

	Esterol de semilla de colza de PEG-5	0,05
	Colesterol	0,05
	Ceteth-3	0,03
	Ceteth-5	0,03
	1,2-hexanodiol	0,05
	Lecitina hidrogenada	0,05
	Estearoil-glutamato de sodio	0,02
	EDTA de disodio	0,01
	Octil-dodecanol	0,25
	Agua purificada	1,56
	Derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido	0,10
Fase adicional II	Fragancia	c.s.
	Conservante	c.s.
	Otros aditivos	c.s.

Método de preparación

(1) Se calentó cada una de entre la fase acuosa y la fase oleosa, se mezcló uniformemente y se disolvió.

5

(2) A 75 °C, se añadió la fase oleosa y se mezcló con la fase acuosa para lograr la solubilización.

(3) A continuación, se enfrió la mezcla hasta 50 °C y luego se añadió la fase I adicional solubilizada en una fase que comprendía el derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido disuelto en la misma, y se mezcló con la emulsión, y luego se añadió la fase II adicional y se mezcló con la emulsión.

10

Ejemplo de formulación 3: Preparación de crema

De acuerdo con la composición que se muestra en la siguiente Tabla 7, se preparó una loción para la piel que comprendía el derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido de acuerdo con el ejemplo.

15

Tabla 7

Fases	Componentes	Contenido (%)
Fase acuosa	Agua purificada	Hasta 100
	Componente humectante	10-25
	Espesante	c.s.
	Agente secuestrante de iones metálicos	c.s.
Fase oleosa	Estearato de PEG-100	0,1-2
	Estearato de glicerilo	0,1-2
	Polisorbato 60	0,1-2
	Ácido esteárico	0,1-2
	Alcohol cetearílico	0,1-2
	Triglicérido caprílico cáprico	10-30
	Acetato de tocoferilo	0,1-0,5
Fase adicional I	Dipropilenglicol	0,23
	Glicerina	0,02
	Esterol de <i>Brassica campestris</i>	0,05
	Esterol de semilla de colza de PEG-5	0,05
	Colesterol	0,05
	Ceteth-3	0,03
	Ceteth-5	0,03
	1,2-hexanodiol	0,05
	Lecitina hidrogenada	0,05
	Estearoil-glutamato de sodio	0,02
	EDTA de disodio	0,01
	Octil-dodecanol	0,25
	Agua purificada	1,56
	Derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido	0,10
Fase adicional II	Fragancia	c.s.
	Conservante	c.s.
	Otros aditivos	c.s.

Método de preparación

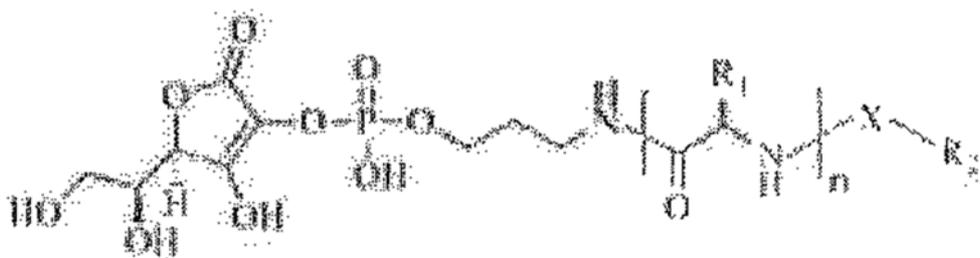
- 5 (1) Se calentó cada una de entre la fase acuosa y la fase oleosa, se mezcló uniformemente y se disolvió.
- (2) A 75 °C, se añadió la fase oleosa y se mezcló con la fase acuosa para lograr la solubilización.
- 10 (3) A continuación, se enfrió la mezcla hasta 50 °C y luego se añadió la fase I adicional solubilizada en una fase que comprendía el derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido disuelto en la misma, y se mezcló con la emulsión, y luego se añadió la fase II adicional y se mezcló con la emulsión.

REIVINDICACIONES

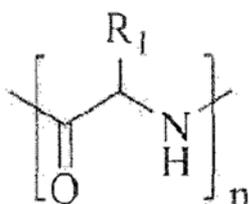
1. Un derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido representado por la siguiente fórmula I o una sal cosméticamente aceptable del mismo:

5

Fórmula I



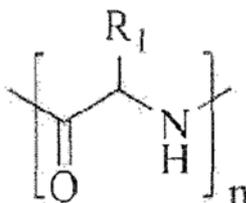
en donde



10 representa un péptido en el que los mismos o diferentes restos de aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácidos naturales o no naturales están unidos por enlaces amida; R₁ representa cadenas laterales de los restos de aminoácidos; X es hidrógeno o carbonilo (C=O); R₂ es nulo cuando X es hidrógeno o R₂ es palmitilo, laurilo o estearilo cuando X es carbonilo; y n es un número entero que varía de 2 a 5.

15

2. El derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido o una sal cosméticamente aceptable del mismo de acuerdo

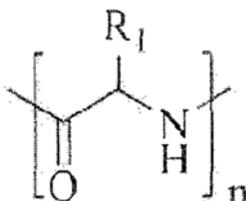


20 con la reivindicación 1, en donde representa un péptido en el que los mismos o diferentes restos de aminoácidos seleccionados entre valina, lisina, glicina, arginina, ácido aspártico, treonina y serina están unidos por enlaces amida.

20

3. El derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido o una sal cosméticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde n es un número entero que varía de 3 a 5.

4. El derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido o una sal cosméticamente aceptable del mismo de acuerdo



25 con la reivindicación 2 o 3, en donde se selecciona entre lisina-valina-lisina y arginina-glicina-ácido aspártico.

25

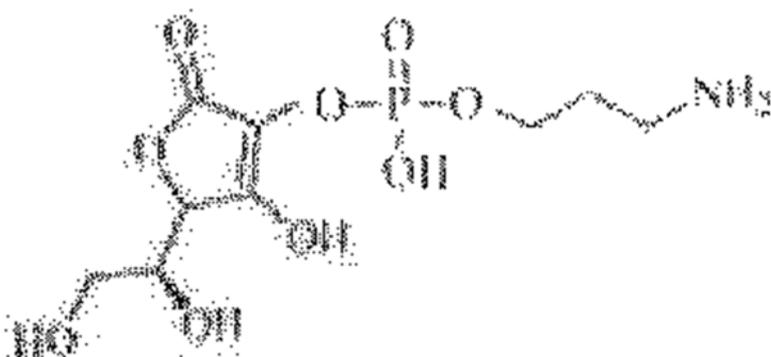
5. El derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido o una sal cosméticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 4, que se selecciona entre los siguientes compuestos:

30

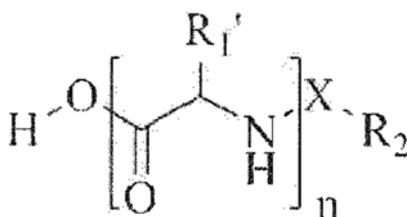
(6S,9S,12S)-6,12-bis(4-aminobutil)-9-isopropil-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazonacosil(5-((S)-1,2-dihidroxi-etil)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)hidrogenofosfato (I-1); y ácido (3S)-3-(2-((S)-2-amino-5-((diaminometil)amino)pentanamido)acetamido)-4-((3-(((5-((S)-1,2-dihidroxi-etil)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)oxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propil)amino)-4-oxobutanoico (I-2).

6. Un método de preparación de un derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido representado por la fórmula I, comprendiendo el método una etapa de someter un compuesto de la siguiente fórmula II a una reacción de condensación con un compuesto de la siguiente fórmula IV, y luego someter un producto de la reacción de condensación a una reacción de desprotección si hay un grupo protector presente en el producto:

Fórmula II

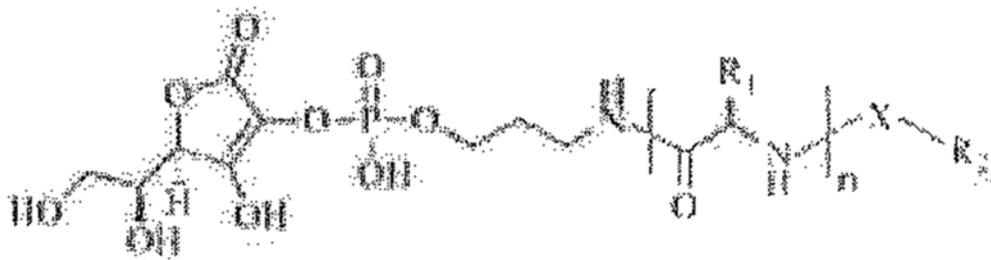


Fórmula IV

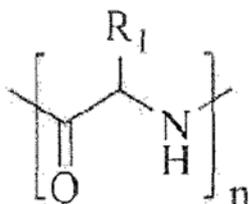


10

Fórmula I



en donde



- 15 $\left[\text{C}(=\text{O})\text{CH}(\text{R}_1)\text{NH} \right]_n$ representa un péptido en el que los mismos o diferentes restos de aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácidos naturales o no naturales están unidos por enlaces amida;
 R_1 representa cadenas laterales de los restos de aminoácidos;
 R_1' es igual a R_1 o es R_1 en el que el grupo amino o el grupo carboxilo está protegido;
 X es hidrógeno o carbonilo ($\text{C}=\text{O}$);
 R_2 es nulo cuando X es hidrógeno o R_2 es palmitilo, laurilo o estearilo cuando X es carbonilo;
 n es un número entero que varía de 2 a 5.

20

7. Una composición cosmética, que comprende el derivado de ácido ascórbico conjugado con péptido o una sal cosméticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y una base

cosméticamente aceptable.

8. La composición cosmética de la reivindicación 7, que se usa para reducir las arrugas de la piel y blanquear la piel.

5 9. La composición cosmética de la reivindicación 7 u 8, en donde el compuesto de fórmula I está comprendido en una cantidad del 0,0001 al 2 % en peso basada en el peso total de la composición cosmética.