(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 786 306**

(51) Int. CI.:

C07C 69/84 (2006.01)
C07C 39/21 (2006.01)
C07C 65/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2015 PCT/US2015/014629**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15120153**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2015 E 15745764 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3102557**

(54) Título: **Composiciones y métodos mejorados que comprenden resveratrol**

(30) Prioridad:

06.02.2014 US 201461936490 P
24.09.2014 US 201462054553 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2020

(73) Titular/es:

BIOCOGENT, LLC (100.0%)
25 Health Sciences Drive
Stony Brook, NY 11790, US

(72) Inventor/es:

CECCOLI, JOSEPH D.;
INGRASSIA, MICHAEL L.;
JUDD, CHRISTOPHER M.;
COSTELLO, BRIAN R. y
SZCZEPANIK, MACIEJ BERNARD

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

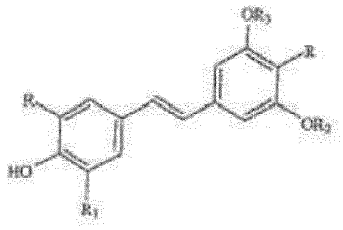
Composiciones y métodos mejorados que comprenden resveratrol

Antecedentes

La presente tecnología se refiere a la síntesis de composiciones de resveratrol, en particular salicilatos de resveratrol, y a composiciones cosméticas y farmacéuticas que comprenden las mismas.

El resveratrol (3,4',5-trihidroxi-*trans*-estilbeno) es un polifenol que se produce de manera natural en al menos 72 especies de plantas. Es un poderoso antioxidante que es superior a las vitaminas C y E así como al galato de propilo. También está presente en la naturaleza en la forma *cis*, y a menudo se produce como glucósido de polidatin (piceid).

Se han realizado intentos para incorporar resveratrol y compuestos que comprenden resveratrol en composiciones cosméticas y farmacéuticas. Sin embargo, su inestabilidad relativa continúa presentando desafíos. Por tanto, existe la necesidad de métodos mejorados para sintetizar compuestos que contienen resveratrol, así como composiciones que comprenden tales compuestos. Por ejemplo, el documento US2013338120 describe derivados de aspirina útiles para prevenir y/o tratar cáncer. Estos compuestos pueden ser útiles para la prevención y/o el tratamiento de cánceres que afectan al aparato digestivo, tales como cáncer colorrectal. El documento WO2004000302 describe análogos de resveratrol de la fórmula proporcionada a continuación:



(I)

en la que R, R_1, R_2 y R_3 son:

1. R=OH, R_1=R_2=R_3=H;

2. R=OH, R_1=Br, R_2=R_3=H;

3. R=R_1=OH, R_2=R_3=H;

4. R=R_1=R_3=H, R_2=3,4,5-trihidroxibenzoílo;

5. R=R_1=H, R_2=R_3=3,4,5-trihidroxibenzoílo;

6. R=R_1=R_3=H, R_2=3,4-dihidroxicinnamoílo;

7. R=R_1=R_3=H, R_2=3,4,5-trihidroxicinnamoílo;

8. R=R_1=R_3=H, R_2=-$CH_2CH_2N(CH_3)_2$;

9. R=R_1=R_3=H, R_2=-$COCH_2NH_2$.HCl.

Estos compuestos mostraron propiedades antioxidantes y son útiles en la industria alimentaria y en productos cosméticos. Los compuestos pueden usarse en una composición farmacéutica como antioxidante o eliminador de radicales libres. El documento US2009068132 describe composiciones cosméticas que contienen ferulato de resveratrol en un portador aceptable por vía tópica. Tales composiciones son eficaces para blanqueamiento de la piel y aplicaciones antienvejecimiento. El documento US8575217 describe métodos para tratar trastornos metabólicos con compuestos que son conjugados. Los conjugados se componen de ácido salicílico, triflusal, diflunisal, salsalato, IMD-0354, ibuprofeno, diclofenaco, licofelona o HTB, y uno o más antioxidantes.

Sumario de la tecnología dada a conocer

En una realización preferida, la presente tecnología se refiere a un método de síntesis de un salicilato de resveratrol tal como se define en la reivindicación 1, comprendiendo el método las etapas de: (a) activar resveratrol en presencia de un primer disolvente para producir resveratrol activado; (b) activar ácido salicílico en presencia de un segundo disolvente para producir ácido salicílico activado; y (c) combinar el resveratrol activado y el ácido salicílico

activado para producir un mezcla de salicilato de resveratrol.

En determinadas realizaciones, la presente tecnología se refiere a un método de síntesis de una mezcla de salicilatos de resveratrol mono, di, tri o polisustituidos tal como se define en la reivindicación 5, comprendiendo el método las etapas de: (a) combinar ácido salicílico activado con resveratrol activado en uno o más disolventes; y (b) controlar la razón o el porcentaje de resveratrol di, tri o polisustituido controlando la razón molar de ácido salicílico activado con respecto a resveratrol activado.

En una realización preferida, la presente tecnología se refiere a una mezcla de salicilatos de resveratrol, comprendiendo la mezcla (a) salicilatos de resveratrol monosustituidos; y (b) salicilatos de resveratrol di y trisustituidos. En determinadas realizaciones, la mezcla puede comprender cualesquiera dos o más de los siguientes: (a) salicilatos de resveratrol monosustituidos; (b) salicilatos de resveratrol disustituidos; (c) salicilatos de resveratrol trisustituidos; o (d) salicilatos polisustituidos.

En determinadas realizaciones, la presente tecnología se refiere a un método de síntesis de una mezcla de resveratrol mono, di o trisustituido tal como se define en la reivindicación 8, comprendiendo el método las etapas de:

(a) combinar ácido salicílico activado con resveratrol activado en uno o más disolventes; y

(b) controlar la razón de salicilatos de resveratrol di, tri o polisustituidos variando la razón molar de ácido salicílico activado con respecto a resveratrol activado.

En una realización preferida, la presente tecnología se refiere a un método de síntesis de un salicilato de resveratrol tal como se define en la reivindicación 10, comprendiendo el método las etapas de:

(a) combinar resveratrol y ácido salicílico con un disolvente para proporcionar una disolución que comprende resveratrol y ácido salicílico; y

(b) poner en contacto la disolución con un activador para proporcionar una disolución que comprende ácido salicílico activado.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1-6 muestran detalles adicionales en cuanto a diversas realizaciones de la tecnología comentada en el presente documento, que incluyen los ejemplos 2 y 3.

Las figuras 7-8 muestran detalles adicionales y etapas de reacción que se refieren a diversas realizaciones de la tecnología comentada en el presente documento, que incluyen el ejemplo 1.

La figura 9 muestra datos de cromatografía de una mezcla de reacción en bruto según diversas realizaciones en el presente documento.

Las figuras 10-11 muestran etapas de reacción que se refieren a la síntesis de salicilatos mono, di, tri y polisustituidos según diversas realizaciones en el presente documento.

La figura 12 muestra datos de cromatografía de una mezcla según diversas realizaciones en el presente documento.

La figura 13 muestra etapas de reacción que se refieren a la síntesis de *trans*-resveratrol y salicilato de sodio según diversas realizaciones en el presente documento.

La figura 14 muestra datos de cromatografía de una mezcla según diversas realizaciones en el presente documento.

La figura 15 muestra etapas de reacción que se refieren a la síntesis según diversas realizaciones en el presente documento.

La figura 16 muestra datos de cromatografía de una mezcla según diversas realizaciones en el presente documento.

La figura 17 muestra etapas de reacción que se refieren a la síntesis según diversas realizaciones en el presente documento.

La figura 18 muestra datos de cromatografía de mezclas según diversas realizaciones en el presente documento.

La figura 19 muestra el análisis de espectroscopía de masas de una mezcla según diversas realizaciones en el presente documento.

La figura 20 muestra datos de cromatografía de una mezcla de reacción en bruto según diversas realizaciones en el

presente documento.

Las figuras 21-26 muestran resultados de datos de ensayos que determinan la actividad antioxidante de diversas mezclas y productos de reacción según la tecnología en el presente documento.

Descripción detallada

El resveratrol es altamente inestable; es lábil en condiciones tanto fuertemente ácidas como fuertemente básicas. Experimenta una extensa oxidación en disoluciones básicas. Cuando se irradia con luz UV que tiene una longitud de onda en el intervalo de 350 a 360 nm, el *trans*-resveratrol se fotoisomeriza para dar el isómero *cis*. El *cis*-resveratrol es menos estable y biológicamente menos activo. La presencia de múltiples grupos funcionales hidroxilo (-OH) en su estructura básica de estilbeno predispone al resveratrol a una variedad de reacciones químicas tales como sustitución electrófila aromática.

Se ha desarrollado en el presente documento un nuevo enfoque de síntesis para convertir resveratrol en una mezcla de salicilatos de resveratrol. En determinadas realizaciones, los métodos en el presente documento producen no sólo salicilato de resveratrol monosustituido, sino también salicilato de resveratrol disustituido, trisustituido y polisustituido, incluyendo formas que son mono, di, tri y polisustituidas (es decir, sustituidas con más de 3) con residuos de polisalicilato de tamaño variable.

En determinadas realizaciones, los métodos comprenden las siguientes etapas: (1) obtener resveratrol, someterlo a un activador y un disolvente para producir resveratrol activado; (2) obtener ácido salicílico, someterlo a un activador y un disolvente para producir salicilato activado.

Los activadores de ácido salicílico útiles son carbodiimidas elegidas de: N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC); N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC); meto-p-toluenosulfonato de N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodiimida (CMC); 1-terc-butil-3-etilcarbodiimida; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); N,N'-di-terc-butilcarbodiimida; N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; o 1,3-di-p-tolilcarbodiimida; diimidazoles elegidos de 1,1'-carbonildiimidazol; 1,1'-tiocarbonildiimidazol; o 1,1'-oxalildiimidazol; y reactivos de uronio o fosfonio elegidos de tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio; hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio; hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio; tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (TSTU); hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido (HATU); hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio (HBTU); o hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilaminomorfolinocarbenio (COMU).

Los activadores de resveratrol se eligen de los siguientes: 1,8-diazabiciclоundec-7-eno (DBU); 1,5-diazabiciclo[4.3.0]non-5-eno (DBN); trietilamina (TEA); 2,6-di-terc-butilpiridina; bases de fosfaceno (t-Bu-P4, BEMP); base de Hünig (diisopropiletilamina, DIPEA); o 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMP).

Los ejemplos de disolventes útiles incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: disolventes apróticos polares, por ejemplo, acetonitrilo; dimetilsulfóxido (DMSO); hexametilfosforamida (HMPA); 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU); 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI); dimetilformamida (DMF); o 1-metil-2-pirrolidinona (NMP) o dimetilaminopiridina (DMAP).

En determinadas realizaciones, la activación puede llevarse a cabo por separado para resveratrol y ácido salicílico. En un ejemplo no limitativo, el resveratrol puede activarse mediante el tratamiento con un activador de resveratrol en un disolvente. De manera similar, el ácido salicílico puede activarse mediante el tratamiento con un disolvente usando un exceso de un activador salicílico. En diversas realizaciones, la reacción de acoplamiento puede ejecutarse entonces en una mezcla 1,5:1 (v/v) de los dos disolventes. En otros ejemplos, pueden usarse carbodiimidas para la activación de ácido salicílico, solas o en combinación con otras moléculas tales como N-hidroxisuccinimida (NHS).

Ejemplo 1

En un ejemplo no limitativo, la activación de resveratrol se ejecuta durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente. Dado que la activación de ácido salicílico es un procedimiento exotérmico, el matraz de reacción puede mantenerse en un baño de enfriamiento mientras se añade el activador de ácido salicílico en porciones a lo largo de un periodo de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, dependiendo de la escala de reacción. En este ejemplo, se activó el ácido salicílico con N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) o diciclohexilcarbodiimida (DCC). Tras completarse la adición de activador de ácido salicílico, el baño de enfriamiento puede (pero no necesita) retirarse. Esta activación también puede ejecutarse durante de aproximadamente 30 a aproximadamente 90 minutos, o más. El resveratrol puede activarse con base de Hünig. Luego puede combinarse la mezcla de reacción que contiene resveratrol activado con el ácido salicílico activado. La mezcla resultante puede agitarse a temperatura ambiente durante, en diversas realizaciones, hasta aproximadamente 72 horas, o aproximadamente 1, aproximadamente 2 o aproximadamente 3 días.

Tal como se demuestra en el presente documento, la distribución de productos de salicilatos de resveratrol es dependiente de la razón molar de ácido salicílico activado con respecto a resveratrol activado, favoreciendo una mayor razón a más producto sustituido. Por tanto, en determinadas realizaciones, la mezcla de salicilato de resveratrol comprende salicilatos de resveratrol mono, di y trisustituidos; las razones de los diversos salicilatos de resveratrol sustituidos en la mezcla pueden controlarse variando la razón molar de ácido salicílico activado con respecto a resveratrol activado, generalmente conduciendo mayores razones del ácido salicílico activado a más productos altamente sustituidos. Por tanto, en determinadas realizaciones, la mezcla de salicilato de resveratrol comprende resveratrol mono, di y trisustituido, y otros salicilatos poliméricos en uno o más grupos hidroxilo del resveratrol; dicho de otro modo, una o más moléculas de ácido salicílico conjugadas con uno cualquiera o más/todos de los hidroxilos en el resveratrol. Por tanto, en determinadas realizaciones, un investigador puede optimizar o controlar las proporciones relativas de resveratrol mono, di, tri y polisustituido con salicilato variando o controlando las razones molares del ácido salicílico activado y el resveratrol activado. Por ejemplo, el investigador puede elegir aumentar la cantidad de salicilatos de resveratrol monosustituidos disminuyendo la razón molar de ácido salicílico activado con respecto a resveratrol activado; en cambio, si desea una mayor proporción de resveratrol sustituido con di, tri o polisalicilato, puede optimizar estas cantidades aumentando la razón molar de ácido salicílico activado con respecto a resveratrol activado. De hecho, en determinadas realizaciones, el investigador puede decidir que maximizar la proporción de producto final de mayor sustitución es un modo más beneficioso de emplear los métodos en el presente documento.

Ejemplo 2

En otro ejemplo no limitativo, el procedimiento para sintetizar salicilatos de resveratrol incluye un procedimiento de activación doble en dos partes. El ácido salicílico se convierte en una disolución de ácido salicílico con la adición de dimetilformamida, y luego se activa con diisopropilcarbodiimida (DIC) para proporcionar ácido salicílico activado, un procedimiento altamente exotérmico que requiere enfriamiento. En la figura 1 se muestra un esquema a modo de ejemplo. El resveratrol se convierte en una disolución de resveratrol con la adición de dimetilsulfóxido, y luego se activa con diisopropiletilamina para proporcionar resveratrol activado. Luego se combinan el resveratrol activado y el ácido salicílico activado, y se deja avanzar la reacción aproximadamente 96 horas a temperatura ambiente. Se lavan los sólidos precipitados con agua ultrapura, y se solubilizan con acetato de etilo; tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 2. Además, se solubilizó el producto sólido precipitado con acetato de etilo para producir una disolución que contenía el producto. Se mezcló la disolución vigorosamente en agua para retirar las impurezas, luego se recogió usando un embudo de separación. Luego se separó el disolvente con un evaporador rotatorio a vacío, y se retiraron manualmente los sólidos secos del matraz, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 3.

Ejemplo 3

En otro ejemplo no limitativo, se observó lo siguiente: en determinadas realizaciones, la presente tecnología se refiere a un único disolvente, una única reacción de activación de ácido salicílico, resveratrol y acetonitrilo con DCC. En la figura 4 se muestra un esquema a modo de ejemplo. Tal reacción difiere de las otras realizaciones de la tecnología en que se refiere un procedimiento de activación doble en dos partes que requiere más limpieza y purificación (por ejemplo, el ejemplo 2). En este ejemplo, el resveratrol y el ácido salicílico están juntos en una disolución con acetonitrilo. Se activa la disolución con diciclohexilcarbodiimida (DCC) mediante adición controlada para proporcionar resveratrol y ácido salicílico activados (un procedimiento altamente exotérmico que requiere enfriamiento). Se mantiene esta disolución a de aproximadamente 10 a aproximadamente 85ºC durante aproximadamente 24 horas, después de los cual se filtra la mezcla de reacción para retirar los sólidos, incluyendo los sólidos que incluyen diciclohexilurea. Se recoge el sobrenadante y se seca usando un evaporador o secador para concentrar los sólidos deseados mientras se mantiene la solubilidad. Puede añadirse un pequeño volumen de agua para neutralizar cualquier DCC activada, y se seca el material para dar el producto final, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 5.

Las ventajas de este ejemplo incluyen las siguientes: sólo se requiere un activador; la reacción puede realizarse en un único reactor y, por tanto, pueden evitarse peligros y retrasos de tiempo de transferencia de SA y resveratrol activados; y existen ahorros de costes significativos asociados con usar sólo un reactor y sólo un activador. Se muestran determinadas realizaciones según este ejemplo en las figuras 4 a 6.

En determinadas realizaciones, la presente tecnología se refiere a un método de síntesis de una mezcla de salicilatos de resveratrol mono, di, tri y polisustituidos, comprendiendo el método las etapas de: (a) combinar ácido salicílico activado con resveratrol activado en uno o más disolventes; y (b) controlar la razón de salicilatos de resveratrol sustituidos variando la razón molar de ácido salicílico activado con respecto a resveratrol activado. Determinadas realizaciones de la presente tecnología también contemplarían la etapa de controlar la hidrólisis del resveratrol polisustituido para dar una distribución deseada de resveratrol modificado con mono, di, tri y polisalicilato.

En los ejemplos en el presente documento, los compuestos diferentemente sustituidos podrían separarse de manera predecible. Se desarrollaron tanto procedimientos de tratamiento final de la reacción como protocolos sofisticados de purificación y aislamiento basados en HPLC, que permitieron la separación y el aislamiento de salicilatos de resveratrol específicamente sustituidos. Por tanto, se ha desarrollado una química fiable para sintetizar salicilatos

según la presente tecnología. Se han establecido métodos cromatográficos para el análisis de la reacción y el aislamiento del producto. Se estableció la composición e identidad de los productos de reacción mediante hidrólisis limitada y exhaustiva y se corroboró mediante espectroscopía de masas, tal como se muestra, por ejemplo, en las figuras 7 a 24.

En particular, la figura 21 muestra resultados de absorción frente a la longitud de onda con un ensayo de DPPH, que indica que las composiciones en el presente documento muestran altos niveles de actividad antioxidante. Además, las figuras 22-24 ilustran, entre otras cosas, un aumento en resveratrol libre y salicilato de resveratrol monosustituido, una disminución global en complejidad y una pérdida aparente de todos los otros derivados de éster. En determinadas realizaciones, pueden optimizarse las condiciones de reacción para generar distribuciones de producto deseado, y puede llevarse a cabo la evaluación de las propiedades antioxidantes de los salicilatos de resveratrol mediante el ensayo de DPPH por HPLC.

Ejemplo 4

Se midió la citotoxicidad de las composiciones en el presente documento. Se sembraron fibroblastos dérmicos o queratinocitos epidérmicos humanos en placas de 96 pocillos y se hicieron crecer hasta confluencia. Se alimentaron pocillos duplicados con medio que contenía concentraciones variables de mezcla de salicilato de resveratrol que se solubilizó en DMSO. La concentración de DMSO se mantuvo constante (0,5%) en todos los pocillos incluyendo los pocillos de control que no incluían salicilato de resveratrol.

Después del contacto con el salicilato de resveratrol durante o bien 17 o bien 65 horas, se retiraron los medios y se incubaron las células durante 1 hora en disolución salina tamponada que contenía resazurina 42 μM. Se midió la fluorescencia (ex. 530/em. 580) de resorufina (producto de reducción de resazurina) después de 1 hora. Todos los datos se normalizaron con respecto a la fluorescencia de los pocillos de control, que representaron el 100% de viabilidad. El grado de reducción de resazurina es una medida de la actividad metabólica mitocondrial total, y es proporcional al número de células. Los resultados se muestran gráficamente en las figuras 25 y 26, y muestran que el salicilato de resveratrol era sólo ligeramente tóxico tanto para fibroblastos como para queratinocitos a la concentración más alta sometida a prueba del 0,016%. Esto provocó una disminución de la viabilidad de aproximadamente el 10% después de una exposición de 65 horas. Sin embargo, la concentración no era tóxica después de una exposición de 17 horas. Todas las concentraciones menores no eran tóxicas en ambos puntos de tiempo. Tal como se usa en el presente documento, “no tóxico” significa que muestra citotoxicidad de menos de aproximadamente el 5%. En determinadas realizaciones, la mezcla de salicilato de resveratrol resultante, cuando se pone en contacto con fibroblastos o queratinocitos, da como resultado una citotoxicidad de menos de aproximadamente el 10% después de 17 horas de contacto. En determinadas realizaciones, las mezclas en el presente documento tienen la característica adicional de que dan como resultado una citotoxicidad de menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 10% o menos de aproximadamente el 5% después de 65 horas de contacto con fibroblastos o queratinocitos.

Las figuras 6-8, 10, 11, 13, 15 y 17 muestran la síntesis de derivados de resveratrol tal como se lleva a cabo según determinadas realizaciones en el presente documento. Las figuras 9, 12, 14, 16, 18 y 20 muestran los resultados de análisis de algunas mezclas a modo de ejemplo que se crearon y sometieron a prueba, muchos de los cuales muestran picos identificativos a diversos tiempos. La figura 19 muestra un análisis de espectroscopía de masas, con un pico de producto principal a 15,8 minutos. Tal como puede observarse en las figuras, se ha establecido en el presente documento que existen métodos para predecir y cuantificar resultados deseados, en cuanto a distribución de salicilatos de resveratrol mediante grados de sustitución deseados, y que los métodos dan como resultado productos estables y de alta calidad que tienen muchas aplicaciones industriales y comerciales.

A diferencia de la presente tecnología, la publicación de Maes (publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0288460) no describe la síntesis real de salicilatos de resveratrol. En cambio, proporciona el procedimiento de síntesis para elaborar trifosfatos de resveratrol, tal como se establece en el documento WO 2006/029484A1. El trabajo enseña el tratamiento de resveratrol en condiciones básicas con fosfato de dibencilo en presencia de dimetilaminopiridina (DMAP). Aunque este procedimiento podría ser aceptable para elaborar trifosfato de resveratrol, no puede usarse para preparar salicilatos de resveratrol. Se intentó un enfoque análogo con salicilato de metilo y no dio lugar a ningún producto. Además, el método descrito es inviable ya que usa tetracloruro de carbono como disolvente. El tetracloruro de carbono es una de las hepatotoxinas y uno de los inductores más potentes de cáncer de hígado.

Un enfoque alternativo, mencionado en la patente estadounidense n.º 6.572.882, implica la síntesis de ésteres de ácido carboxílico de resveratrol mediante la reacción de Schotten-Baumann. El procedimiento se basa en el tratamiento de resveratrol en condiciones básicas con cloruros de ácido carboxílico disponibles comercialmente. Aunque es posible para ácidos carboxílicos simples, el método no puede usarse para elaborar salicilatos, ya que no puede prepararse cloruro de ácido salicílico debido a la presencia del grupo orto-hidroxilo interferente.

En resumen, la presente tecnología es muy superior por muchos motivos, incluyendo, pero no limitados a, los siguientes: los métodos en el presente documento son diferentes de aquellos conocidos en la técnica; los métodos

en el presente documento generan salicilatos de resveratrol como productos, y estos productos pueden confirmarse (presencia e identidad) mediante análisis tanto espectral como químico; y los métodos en el presente documento pueden usarse para obtener muchos salicilatos de resveratrol diferentes, incluyendo, pero no limitados a, polisalicilatos de resveratrol. Los enfoques de síntesis y métodos de purificación posteriores usados en el presente documento pueden evitar disolventes tóxicos y mutágenos, y son muy susceptibles al aumento de escala.

Aunque la presente tecnología se ha descrito en relación con realizaciones particulares de la misma, estas realizaciones y ejemplos son simplemente a modo de ejemplo y no pretenden ser limitativos. Resultará evidente para un experto habitual en la técnica que los aspectos de la tecnología, tal como se describió anteriormente, pueden tener muchas aplicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método de síntesis de un salicilato de resveratrol, comprendiendo el método las etapas de:

(a) activar resveratrol en presencia de un primer disolvente para producir resveratrol activado;

(b) activar ácido salicílico en presencia de un segundo disolvente para producir ácido salicílico activado; y

(c) combinar el resveratrol activado y el ácido salicílico activado para producir una mezcla de salicilato de resveratrol;

en el que el resveratrol se activa mediante el tratamiento con el primer disolvente elegido de 1,8-diazabiciclоundec-7-eno (DBU); 1,5-diazabiciclo[4.3.0]non-5-eno (DBN); trietilamina (TEA); 2,6-di-terc-butilpiridina; bases de fosfaceno (t-Bu-P4, BEMP); base de Hünig (diisopropiletilamina, DIPEA); y 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMP), y

en el que el ácido salicílico se activa mediante el tratamiento con cualquiera de los siguientes:

i) una carbodiimida elegida de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC); N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC); meto-p-toluenosulfonato de N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodiimida (CMC); 1-terc-butil-3-etilcarbodiimida; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); N,N'-di-terc-butilcarbodiimida; N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; o 1,3-di-p-tolilcarbodiimida;

ii) un diimidazol elegido de 1,1'-carbonildiimidazol; 1,1'-tiocarbonildiimidazol; o 1,1'-oxalildiimidazol; o

iii) un reactivo de uronio o fosfonio, elegido de tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio; hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio; hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio; tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (TSTU); hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido (HATU); hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio (HBTU); o hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilaminomorfolinocarbenio (COMU).

2. Método según la reivindicación 1, en el que la mezcla de salicilato de resveratrol comprende salicilatos de resveratrol mono, di y trisustituidos en uno o más hidroxilos del resveratrol.

3. Método según la reivindicación 1, en el que uno o ambos del primer disolvente o el segundo disolvente es/son un disolvente aprótico polar elegido de acetonitrilo; dimetilsulfóxido (DMSO); hexametilfosforamida (HMPA); 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU); 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI); dimetilformamida (DMF) o 1-metil-2-pirrolidinona (NMP).

4. Método según la reivindicación 1, en el que el ácido salicílico se activa mediante el tratamiento con una carbodiimida de (i) en combinación con N-hidroxisuccinimida (NHS).

5. Método según la reivindicación 1 de síntesis de una mezcla de salicilatos de resveratrol mono, di, tri o polisustituidos, comprendiendo el método la etapa de variar la razón de salicilatos de resveratrol di, tri o polisustituidos aumentando la razón molar de resveratrol activado con respecto a ácido salicílico activado.

6. Mezcla de salicilatos de resveratrol, comprendiendo la mezcla cualesquiera dos o más de los siguientes:

(a) salicilatos de resveratrol monosustituidos;

(b) salicilatos de resveratrol disustituidos;

(c) salicilatos de resveratrol trisustituidos; o

(d) salicilatos polisustituidos.

7. Mezcla de salicilatos de resveratrol según la reivindicación 6, comprendiendo la mezcla:

(a) salicilatos de resveratrol monosustituidos; y

(b) salicilatos de resveratrol di y trisustituidos.

8. Método según la reivindicación 1 de síntesis de una mezcla de salicilatos de resveratrol mono, di, tri o polisustituidos, comprendiendo el método la etapa de controlar la razón de salicilatos de resveratrol di, tri o polisustituidos variando la razón molar de ácido salicílico activado con respecto a resveratrol activado.

9. Método según la reivindicación 8, que comprende además la etapa de controlar la hidrólisis del resveratrol polisustituido para dar una distribución deseada de resveratrol modificado con mono, di, tri o polisalicilato.

10. Método de síntesis de un salicilato de resveratrol, comprendiendo el método las etapas de:

(a) combinar resveratrol y ácido salicílico con un disolvente para proporcionar una disolución que comprende resveratrol y ácido salicílico; y

(b) poner en contacto la disolución con un activador para proporcionar una disolución que comprende ácido salicílico activado;

en el que el activador se elige de los siguientes:

(i) una carbodiimida elegida de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC); N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC); meto-p-toluenosulfonato de N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodiimida (CMC); 1-terc-butil-3-etilcarbodiimida; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); N,N'-di-terc-butilcarbodiimida; N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; o 1,3-di-p-tolilcarbodiimida;

(ii) un diimidazol elegido de 1,1'-carbonildiimidazol; 1,1'-tiocarbonildiimidazol; o 1,1'-oxalildiimidazol; o

(iii) un reactivo de uronio o fosfonio, elegido de: tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio; hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio; hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio; tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (TSTU); hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido (HATU); hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio (HBTU); o hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilaminomorfolinocarbenio (COMU).

11. Método según la reivindicación 10, que comprende además la etapa de:

(c) secar la disolución para producir un salicilato de resveratrol sólido.

12. Método según la reivindicación 10, en el que el disolvente se elige de acetonitrilo; dimetilsulfóxido (DMSO); hexametilfosforamida (HMPA); 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU); 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI); dimetilformamida (DMF); 1-metil-2-pirrolidinona (NMP); y dimetilaminopiridina (DMAP).

Ejemplo 2

FIG. 1

Ejemplo 2 continuación

FIG. 2

Ejemplo 2 continuación

- Producto sólido precipitado solubilizado con acetato de etilo

- Se mezcló vigorosamente la disolución que contenía producto en agua para retirar impurezas.

- Se recogió la disolución de acetato de etilo que contenía producto usando un embudo de separación.

- Disolución que contenía producto separada del disolvente usando un evaporador rotatorio a vacío.

- Sólidos secos retirados del matraz manualmente

FIG. 3

Ejemplo 3

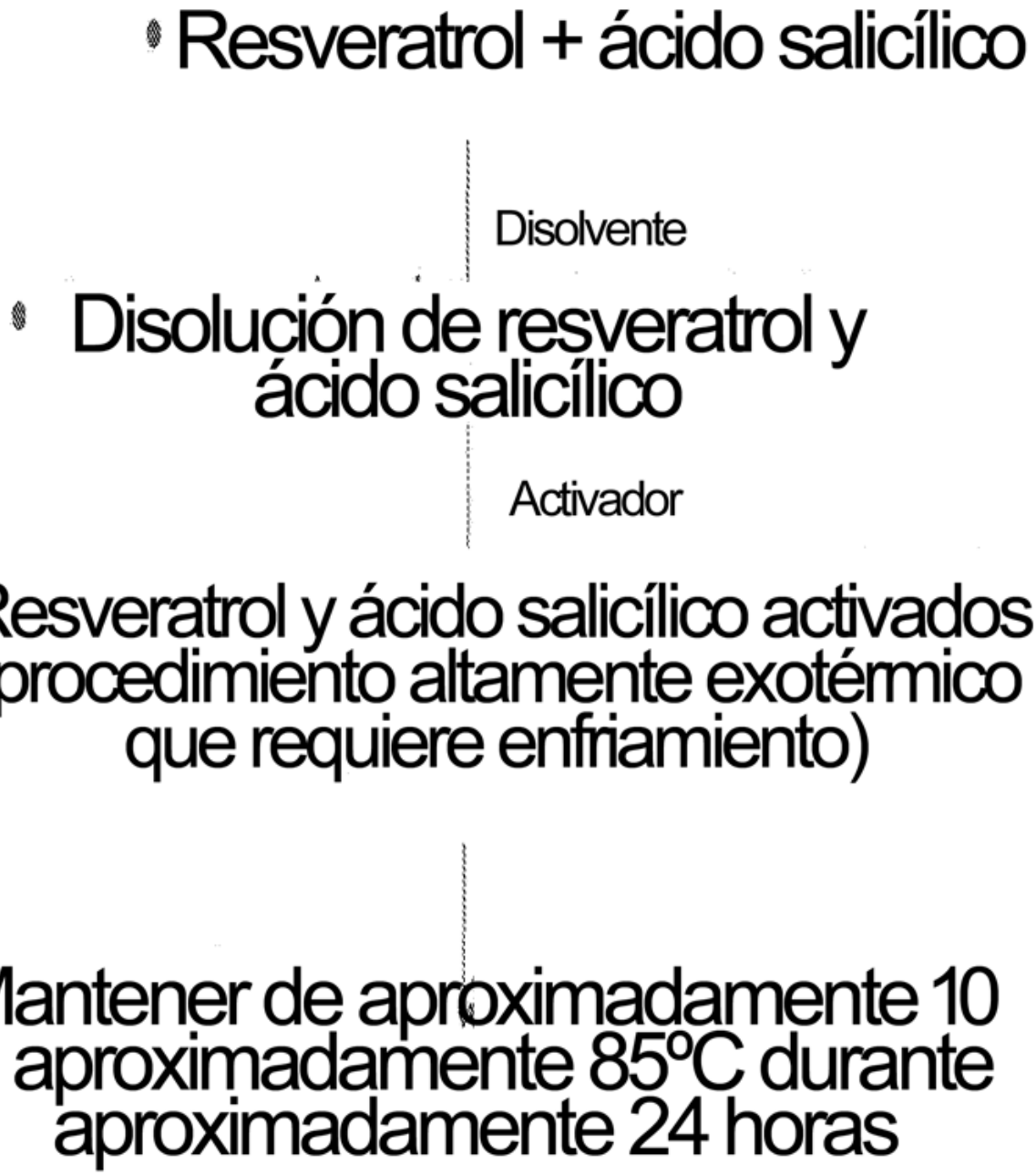


FIG. 4

Ejemplo 3 continuación

Purificación y secado del producto final

- Se filtra la mezcla de reacción para retirar sólidos (tales como diciclohexilurea)
- Sobrenadante recogido y secado usando un evaporador/secador para concentrar los sólidos deseados mientras se mantiene la solubilidad
- Se añade un pequeño volumen de agua para neutralizar cualquier DCC activada
- Secar hasta sólidos (eliminación de disolvente y H_2O) para dar el producto final

FIG. 5

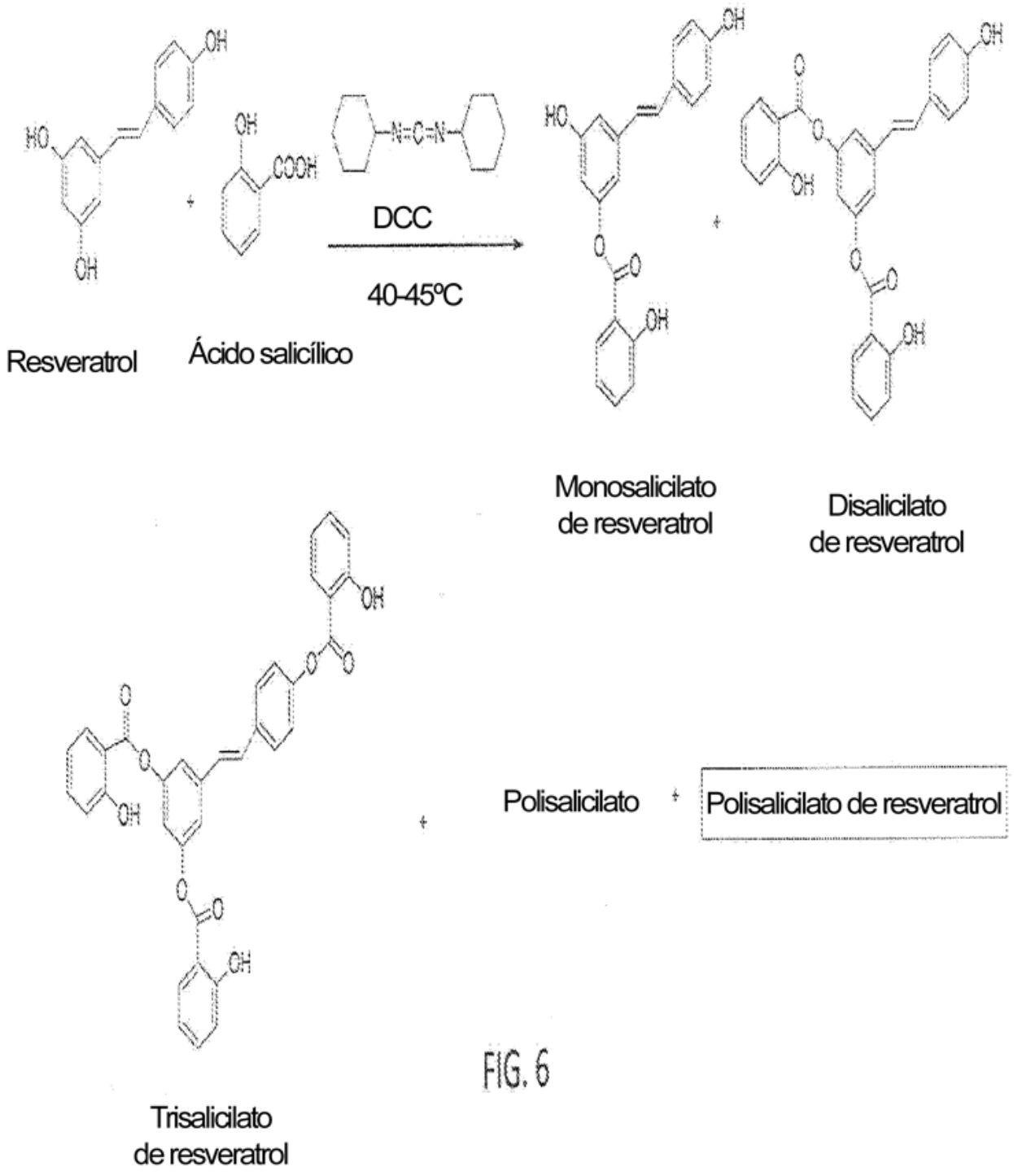
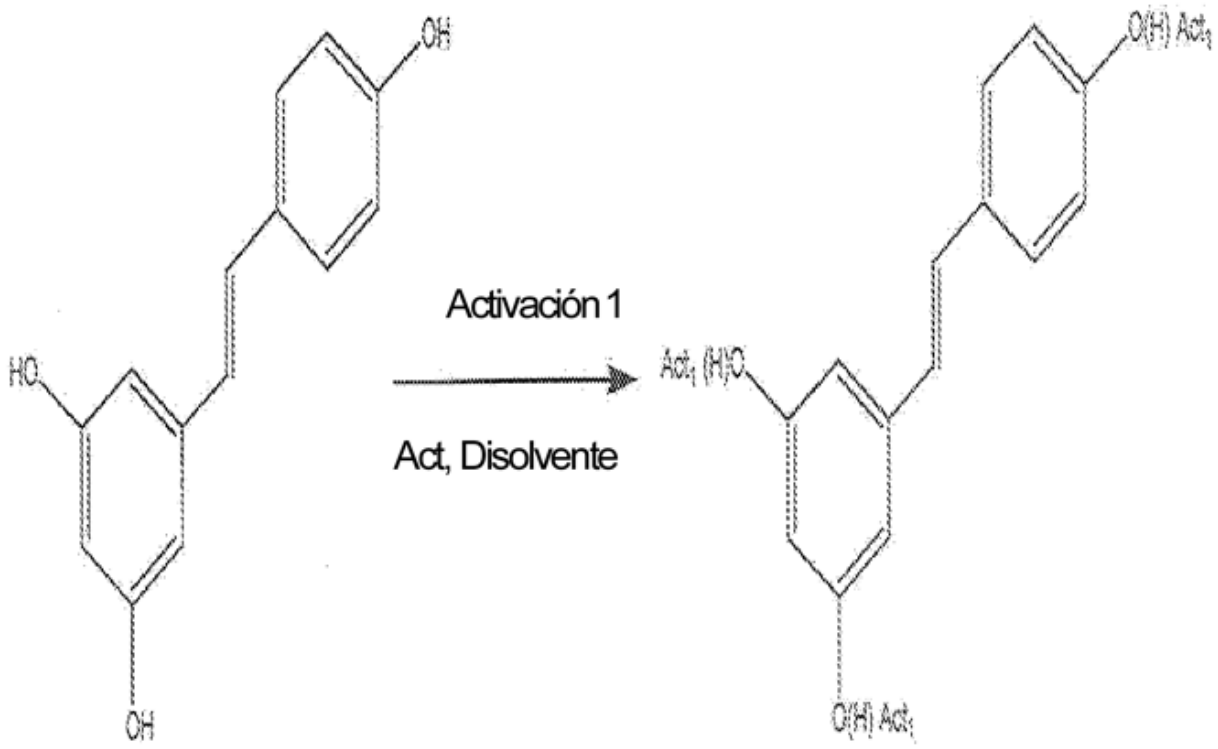

Síntesis de derivados de salicilato de resveratrol
HO
OH
OH
OH
COOH
N=C=N
DCC
40-45ºC
Resveratrol
Ácido salicílico
Monosalicilato de resveratrol
Disalicilato de resveratrol
Trisalicilato de resveratrol
Polisalicilato
Polisalicilato de resveratrol

FIG. 6

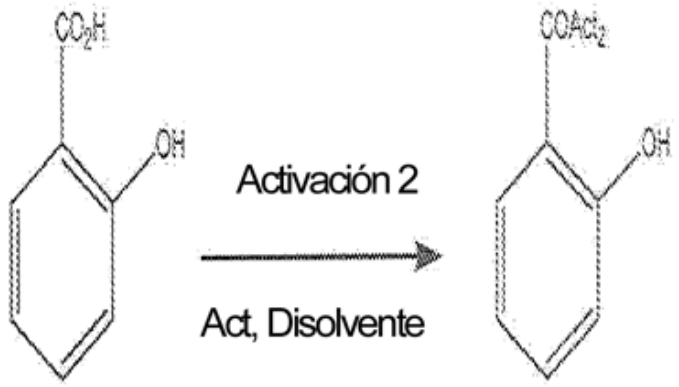
Enfoque de síntesis



Act = Activador

trans-Resveratrol

FIG. 7



Ácido salicílico

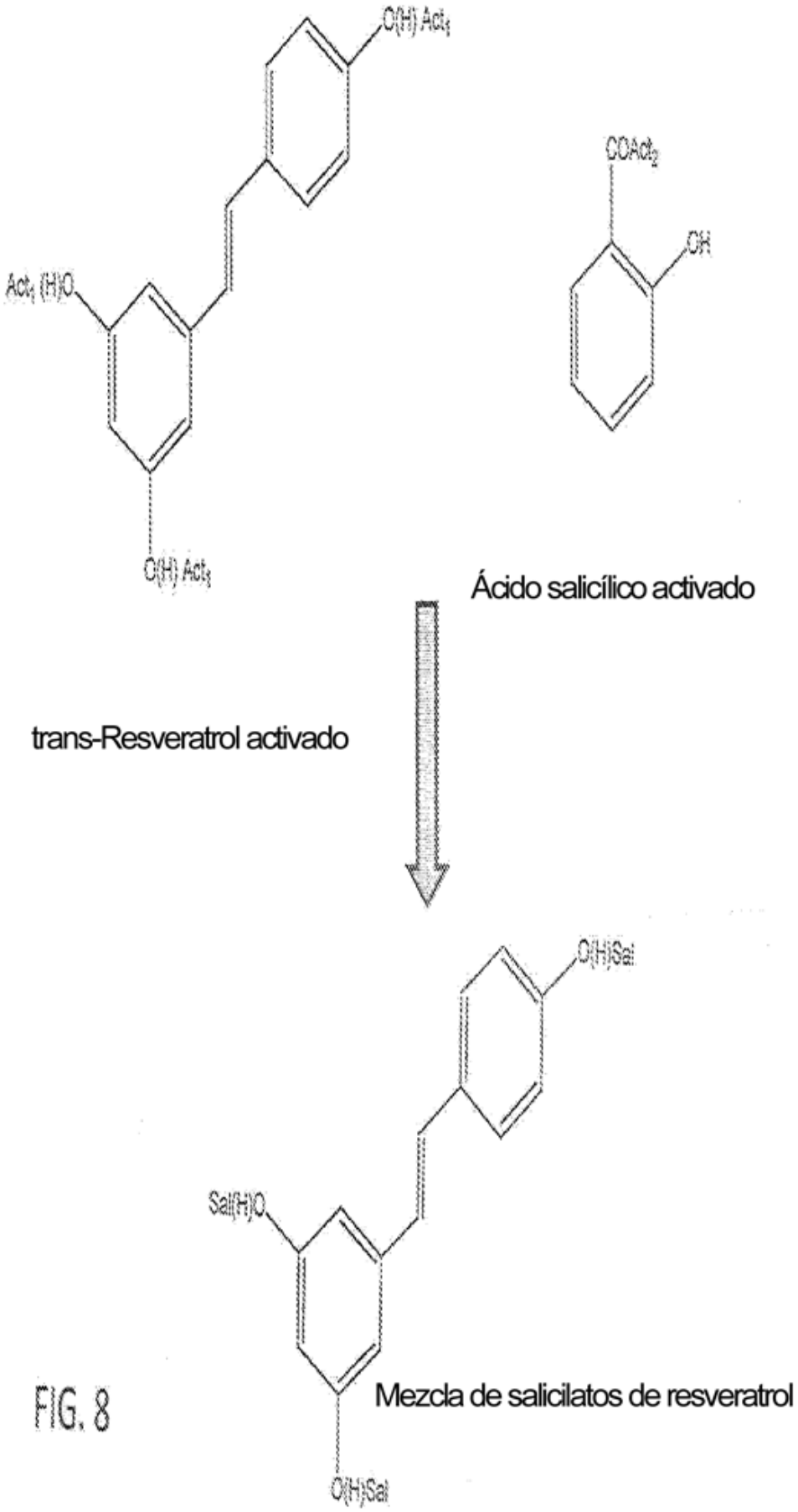

O(H) Act1
Act1 (H)O
O(H) Act1
COAct2
OH
Ácido salicílico activado
trans-Resveratrol activado
O(H)Sal
Sal(H)O
O(H)Sal
Mezcla de salicilatos de resveratrol

FIG. 8

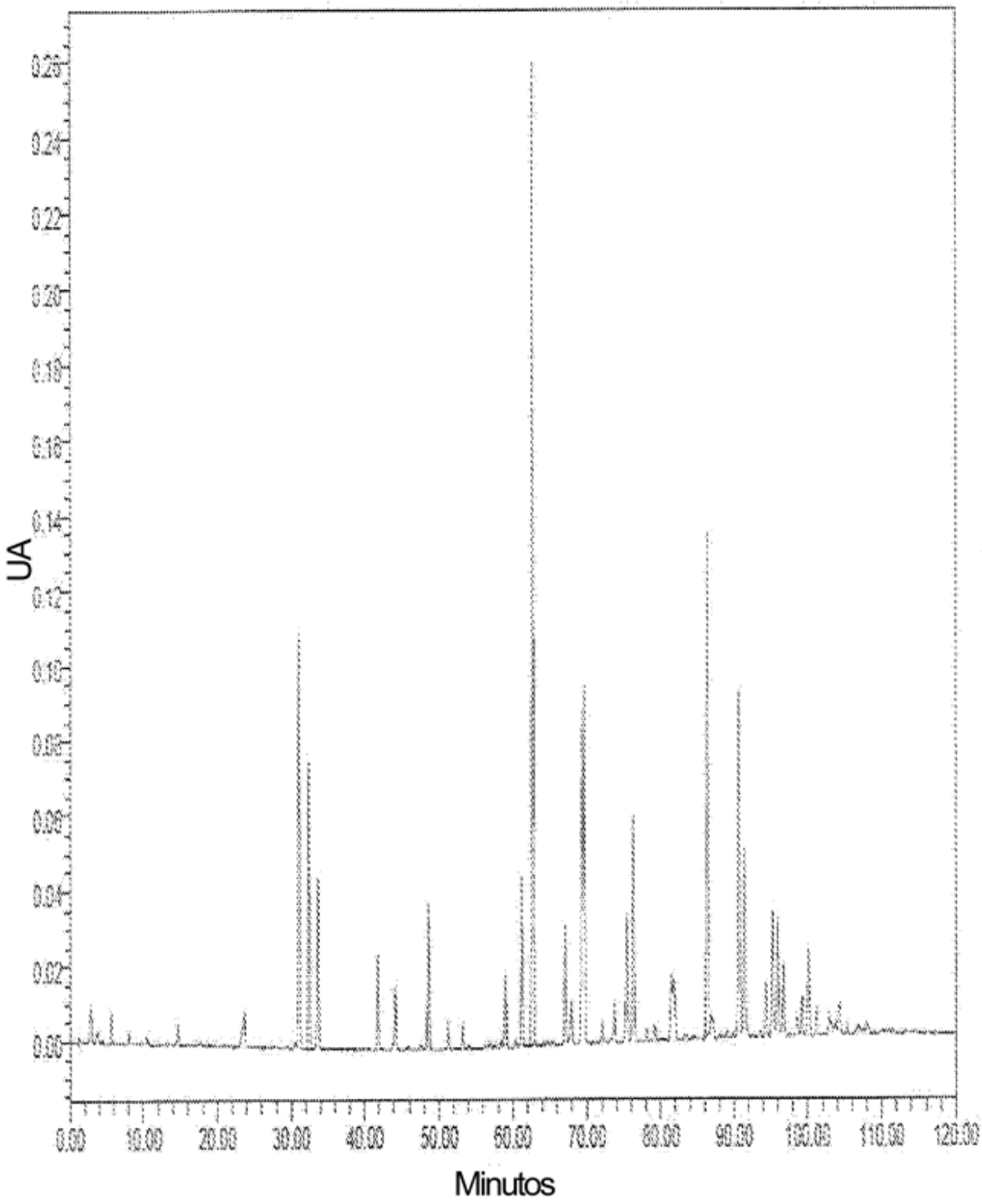
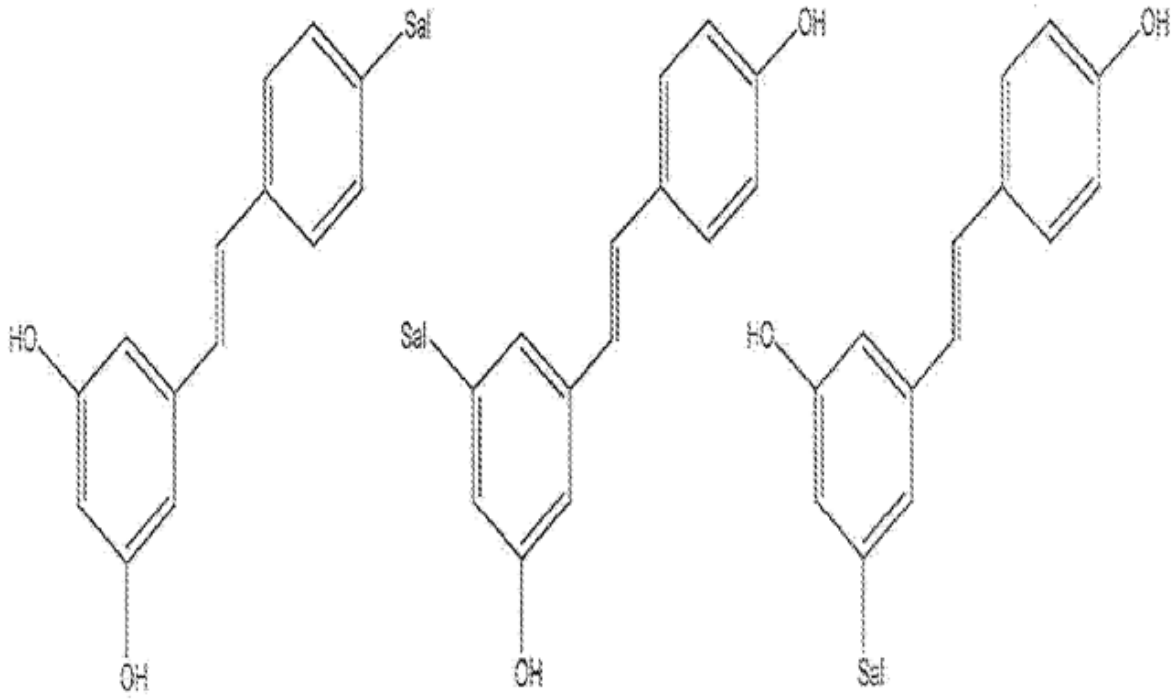


FIG. 9

Gradiente de HPLC



Salicilatos de resveratrol monosustituidos

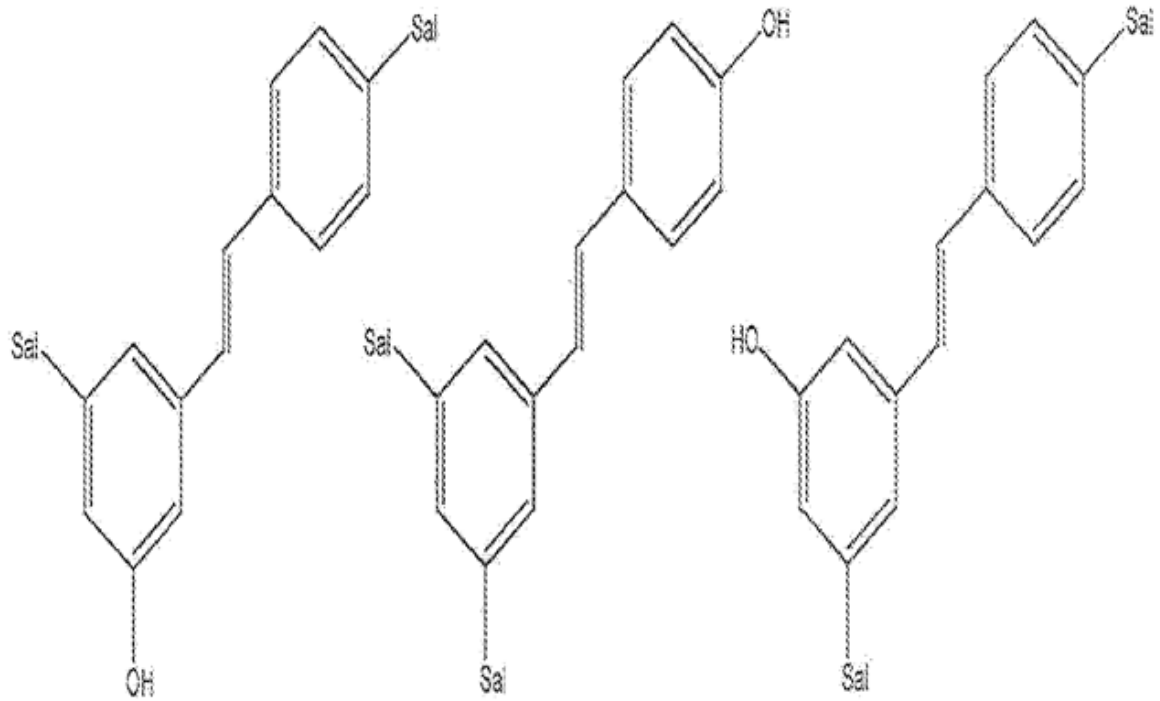
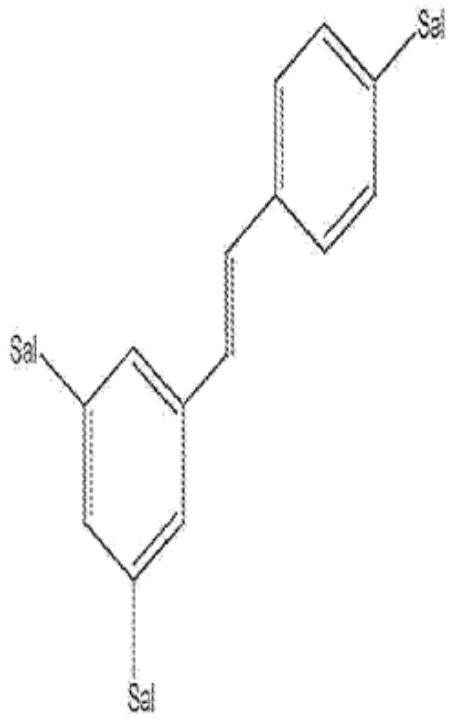
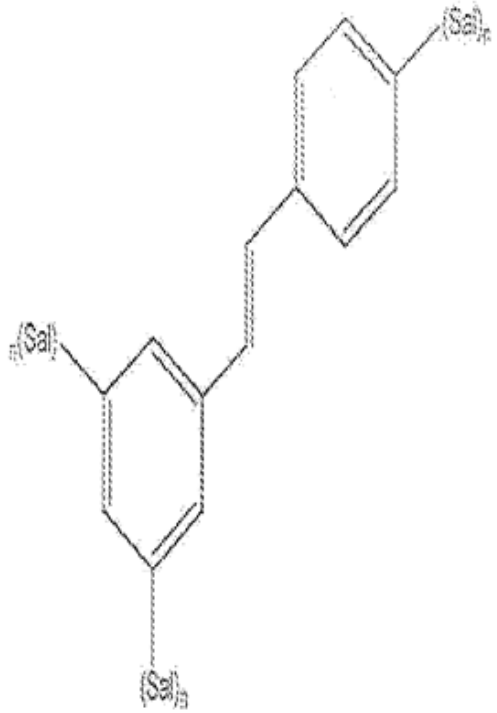


FIG. 10

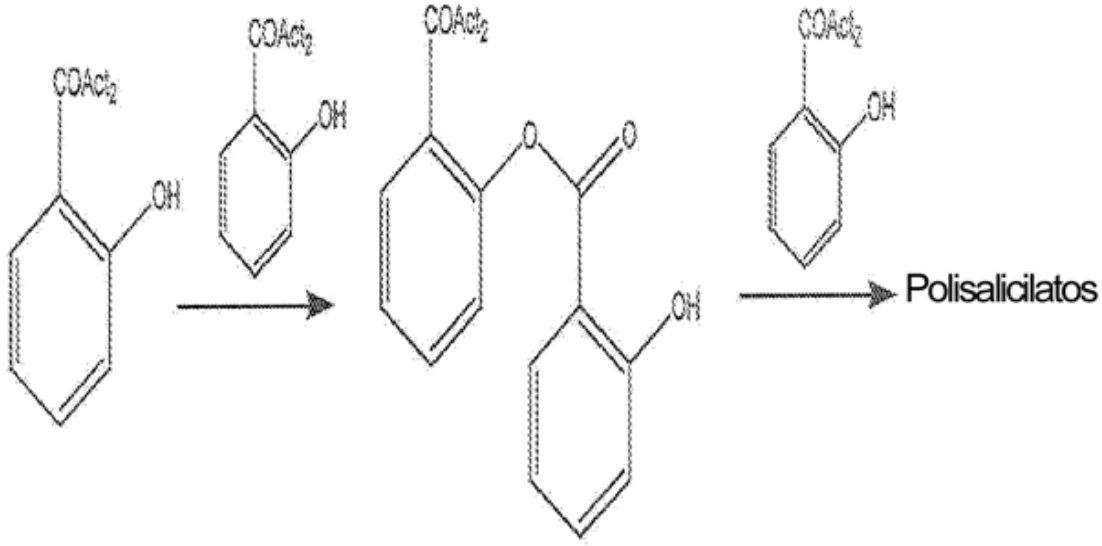
Salicilatos de resveratrol disustituidos



Salicilato de resveratrol trisustituido



Salicilatos de resveratrol polisustituidos

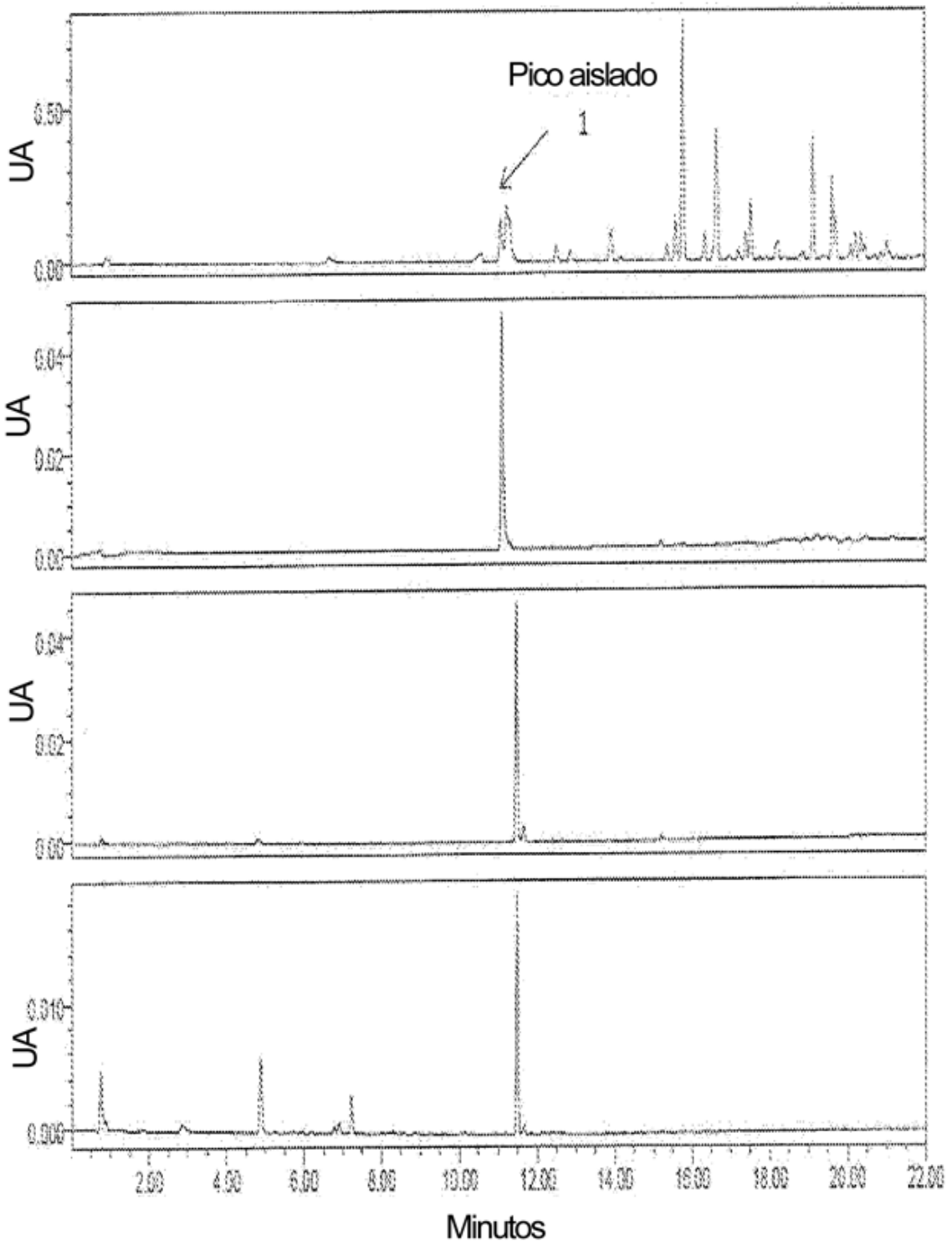


Ácido salicílico activado

Disalicilato

FIG. 11

HIDRÓLISIS LIMITADA

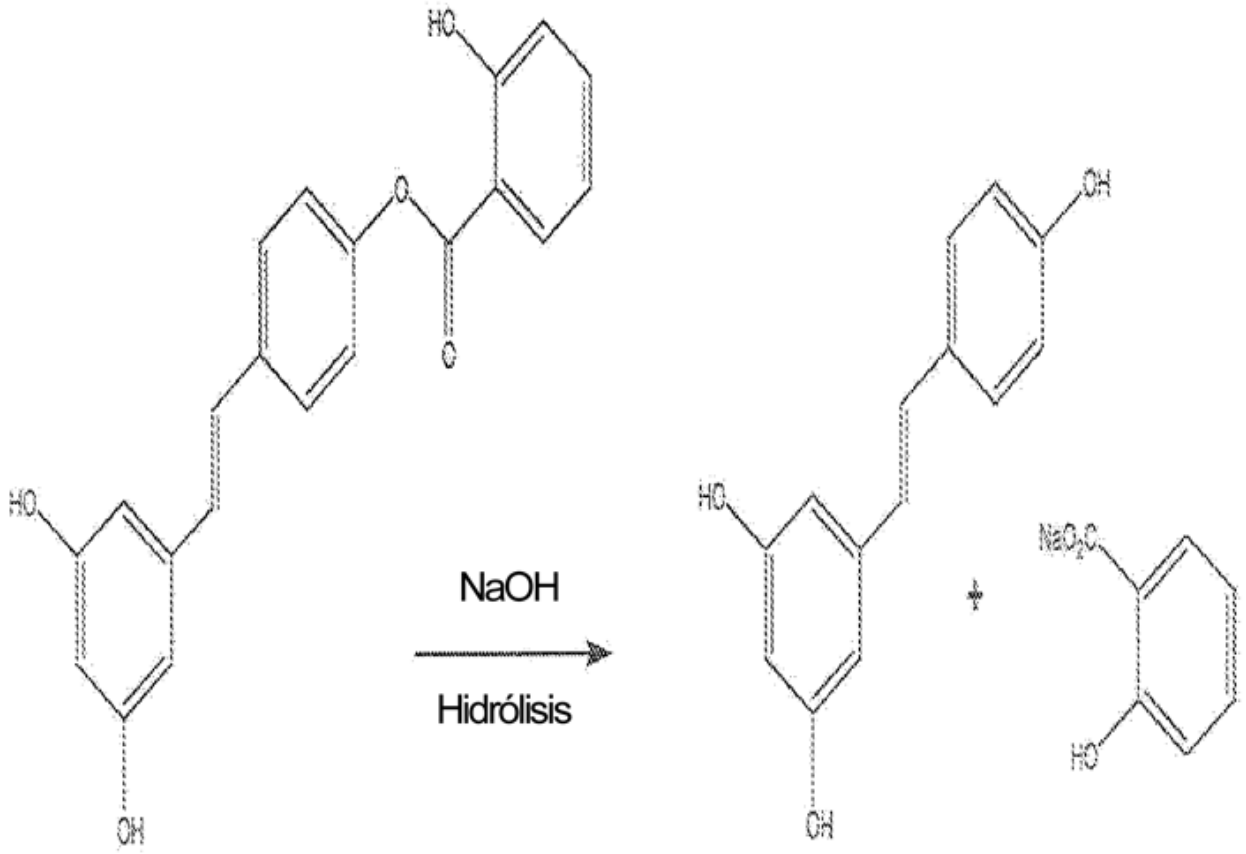


Parte superior: mezcla de reacción 3º: pico a 11,1 min + NaOH 50 µmol

FIG. 12 2º: pico a 11,1 min aislado 4º: pico a 11,1 min + NaOH 500 µmol

Hidrólisis limitada

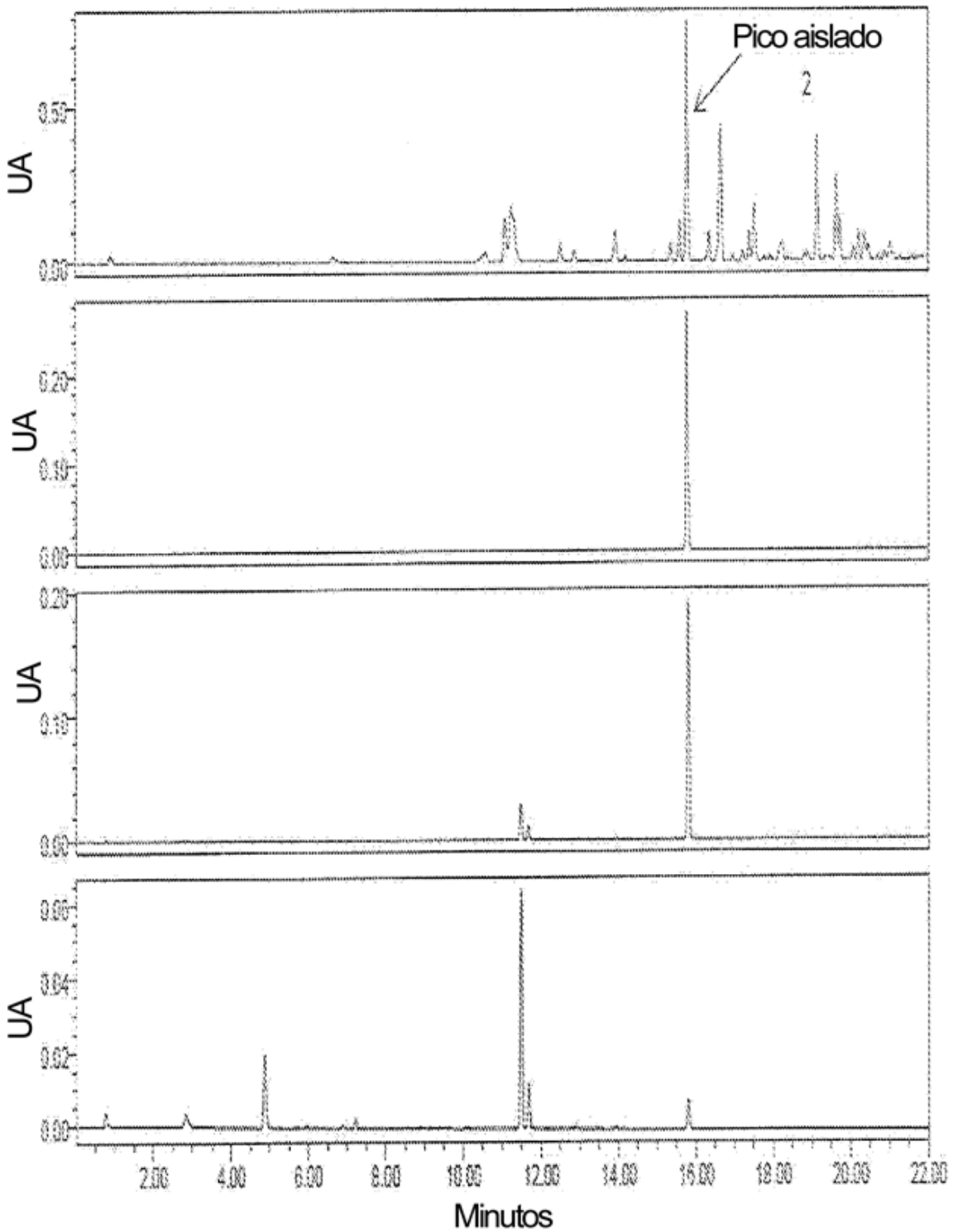
Pico a 11,1 min



trans-Resveratrol Salicilato de sodio

FIG. 13

HIDRÓLISIS LIMITADA



Parte superior: mezcla de reacción
2º: pico a 15,8 min aislado
3º: pico a 15,8 min + NaOH 50 µmol
4º: pico a 15,8 min + NaOH 500 µmol

FIG. 14

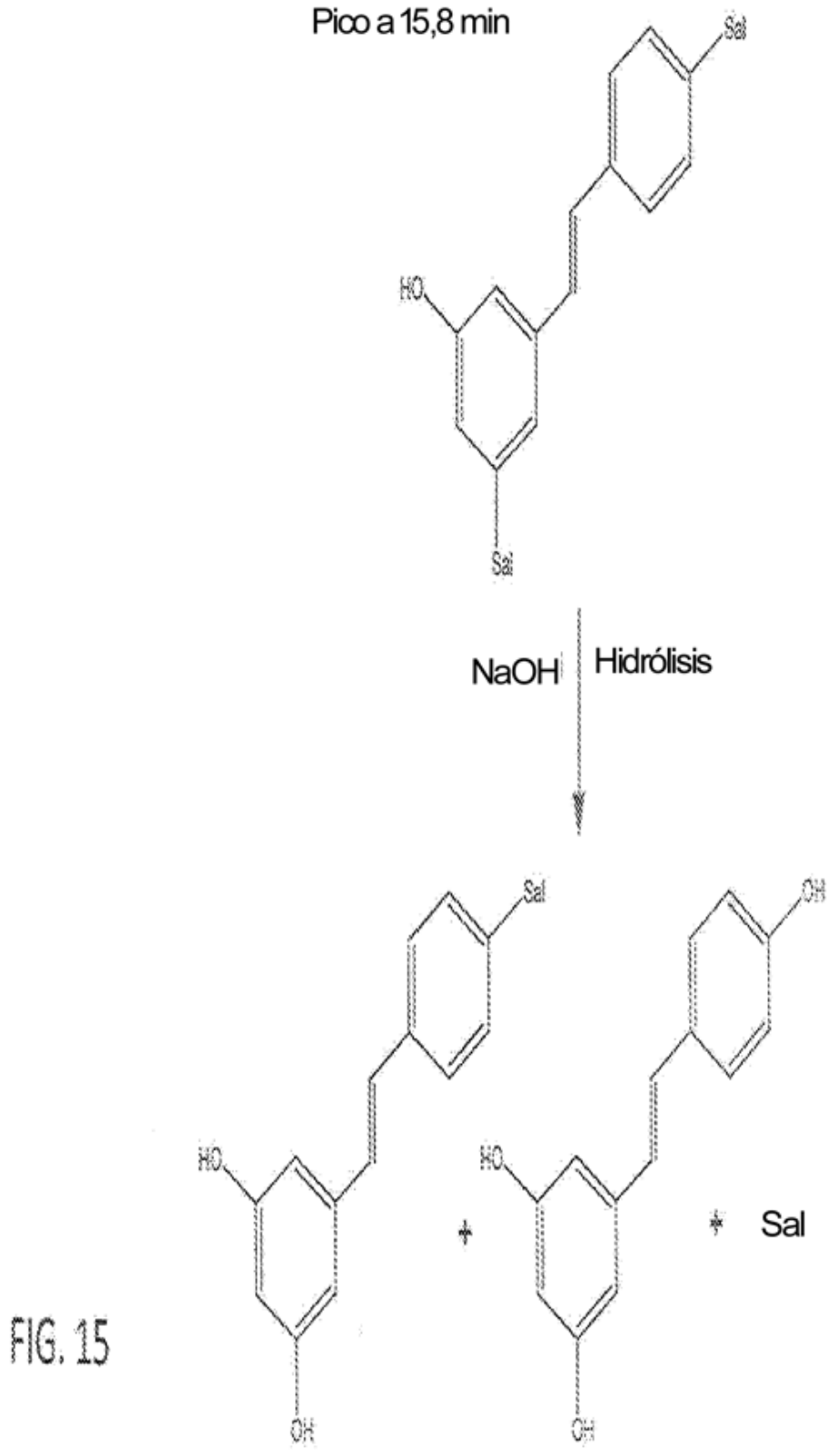
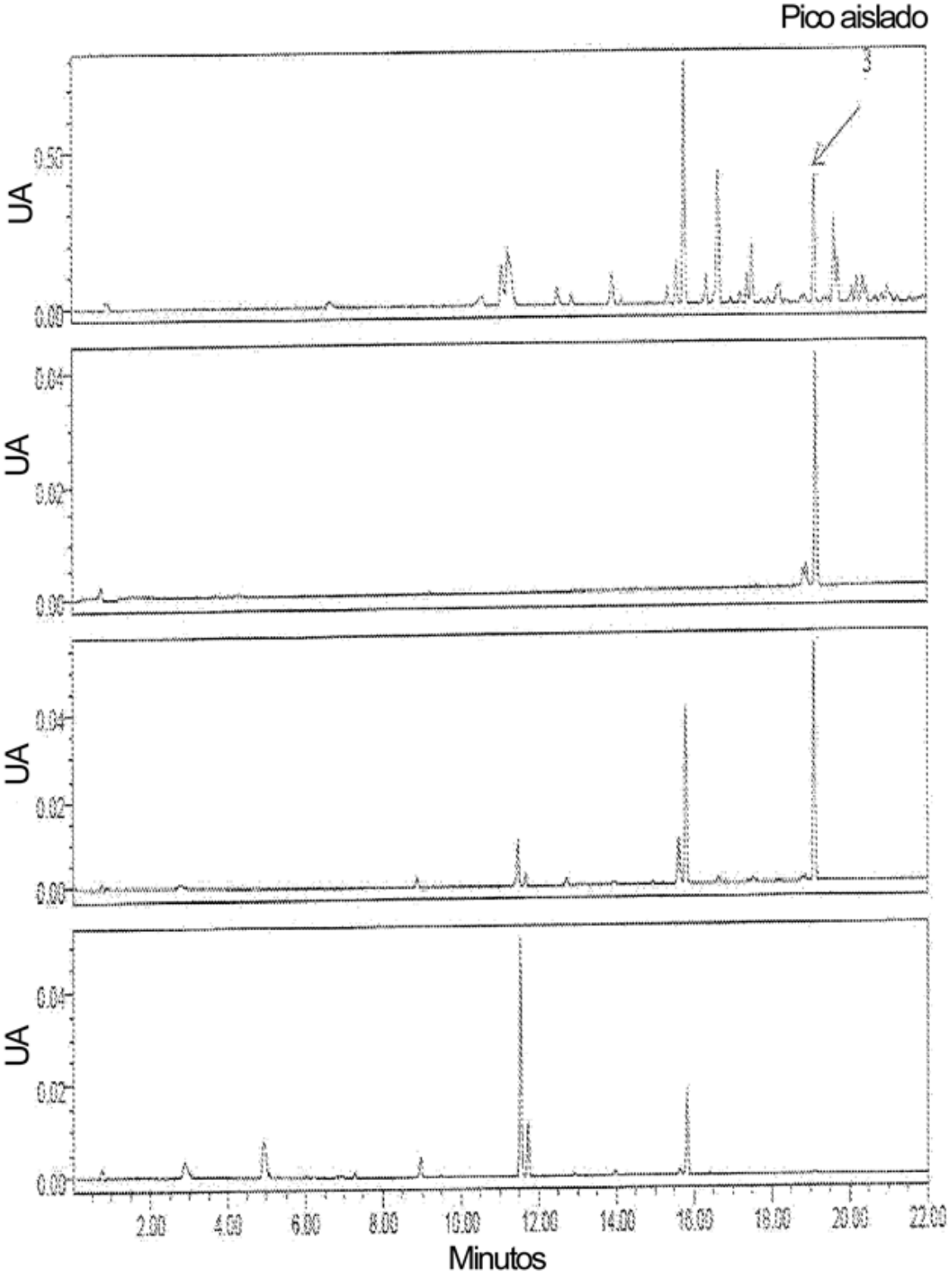

Hidrólisis limitada
Pico a 15,8 min
Sal
HO
Sal
NaOH
Hidrólisis
Sal
OH
HO
HO
+
+
Sal
OH
OH

FIG. 15

HIDRÓLISIS LIMITADA



Parte superior: mezcla de reacción
2º: pico a 19,1 min aislado
3º: pico a 19,1 min + NaOH 50 µmol
4º: pico a 19,1 min + NaOH 500 µmol

FIG. 16

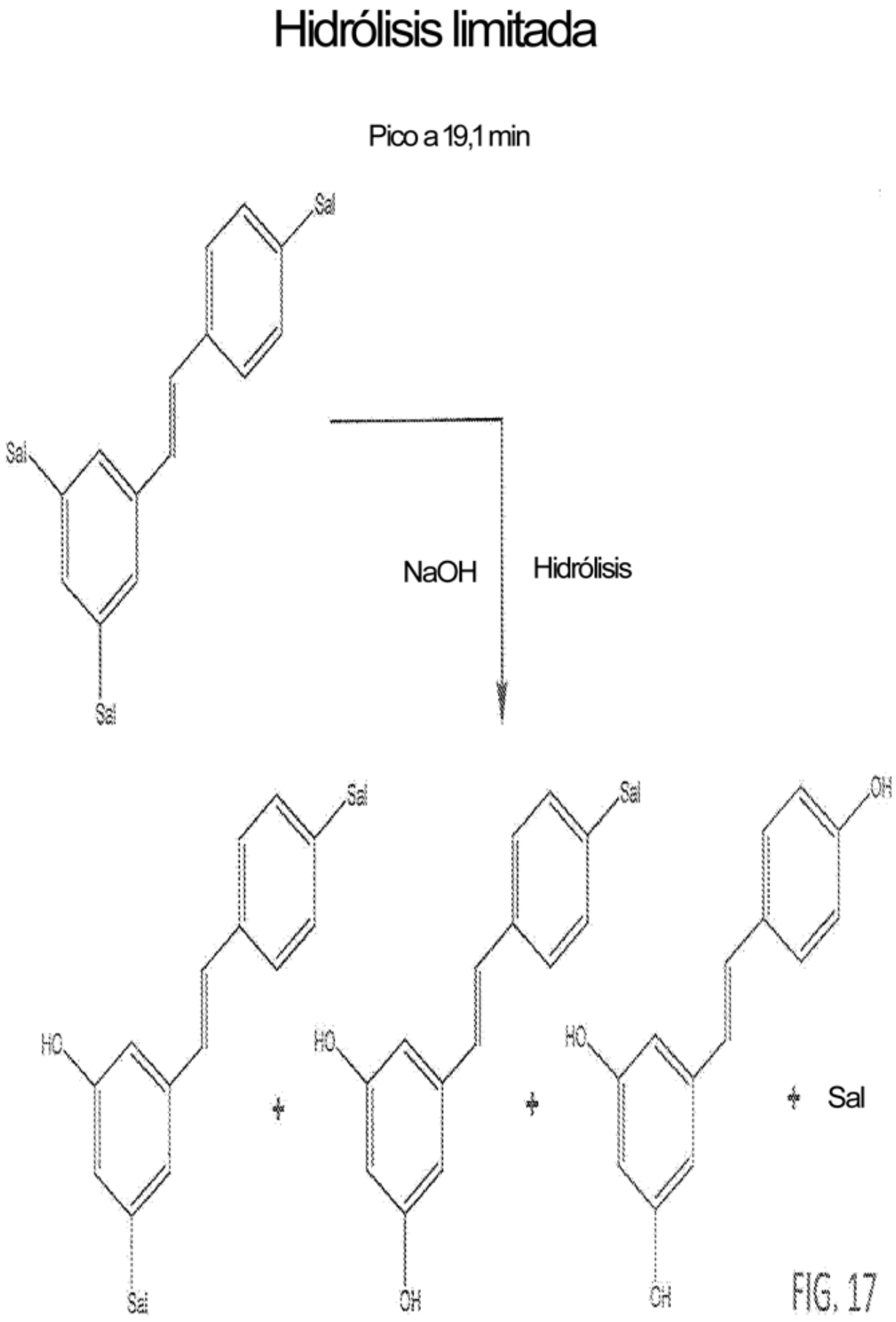

Hidrólisis limitada
Pico a 19,1 min
Sal
Sal
Sal
NaOH
Hidrólisis
Sal
Sal
OH
HO
HO
HO
+
+
+
Sal
Sal
OH
OH

FIG. 17

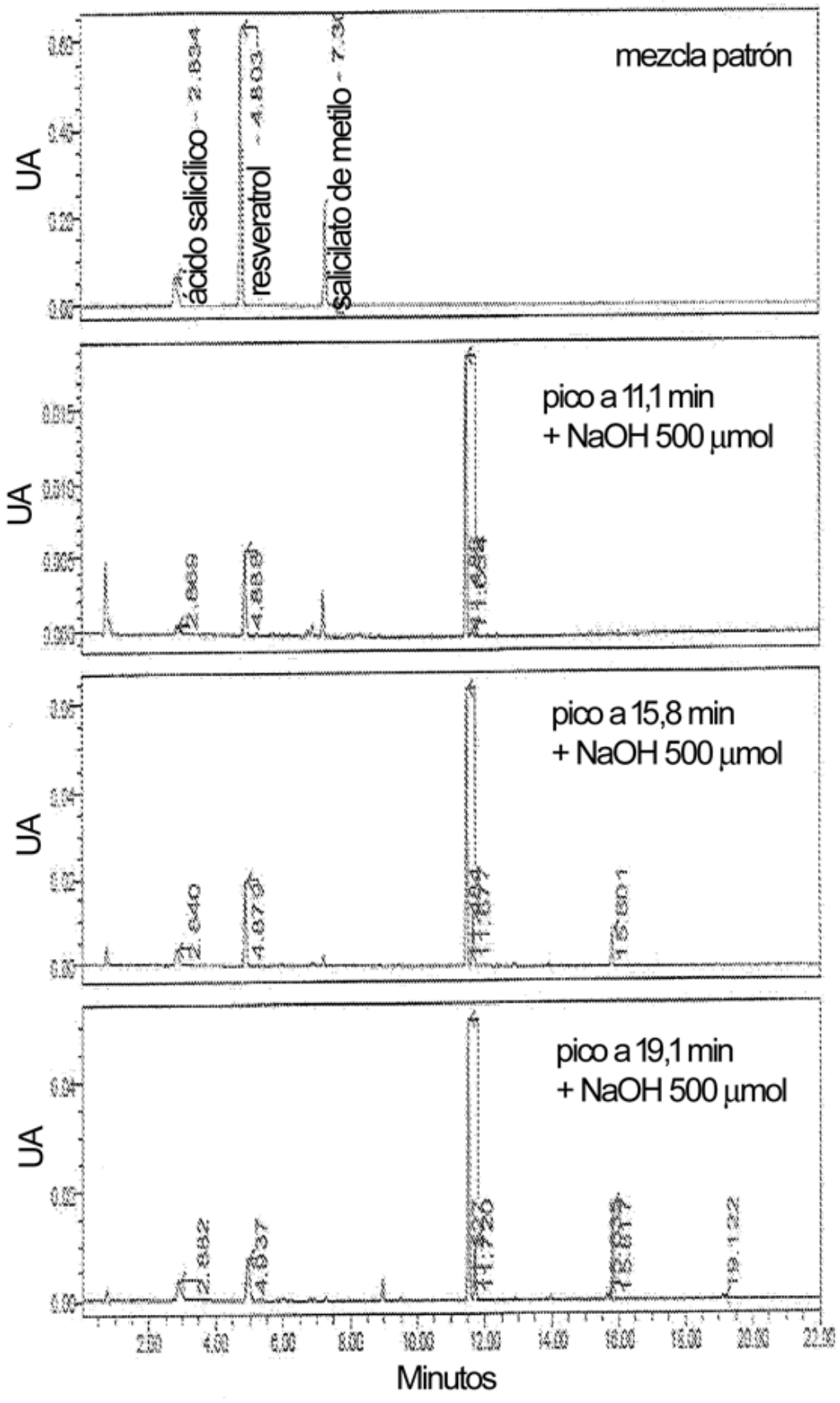

mezcla patrón
ácido salicílico - 2.834
resveratrol - 4.803
salicilato de metilo - 7.30
UA
pico a 11,1 min
+ NaOH 500 µmol
pico a 15,8 min
+ NaOH 500 µmol
pico a 19,1 min
+ NaOH 500 µmol
Minutos

FIG. 18

Análisis de espectroscopía de masas

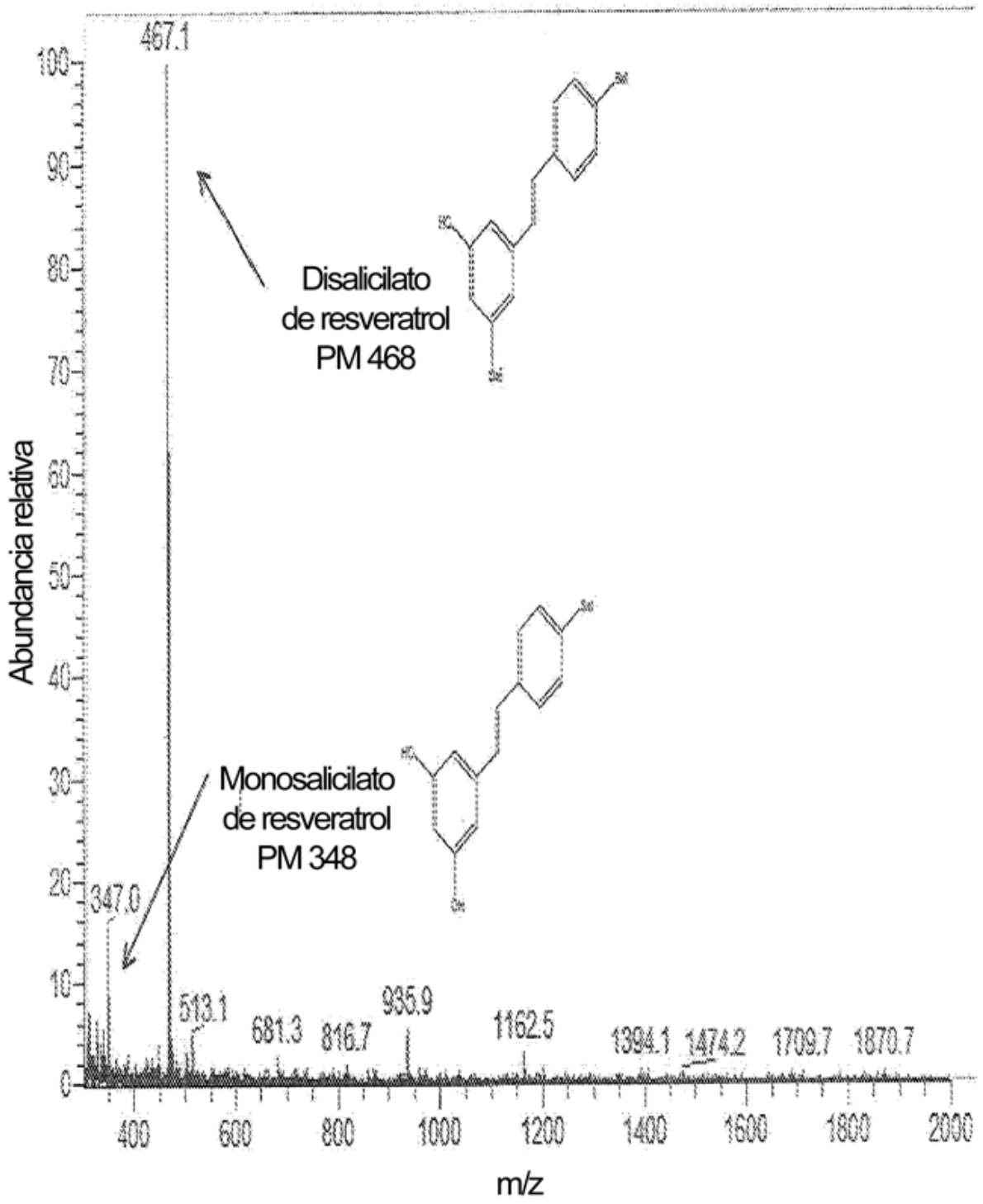


FIG. 19 Modo de ion negativo [M-H], producto principal, pico a 15,8 min

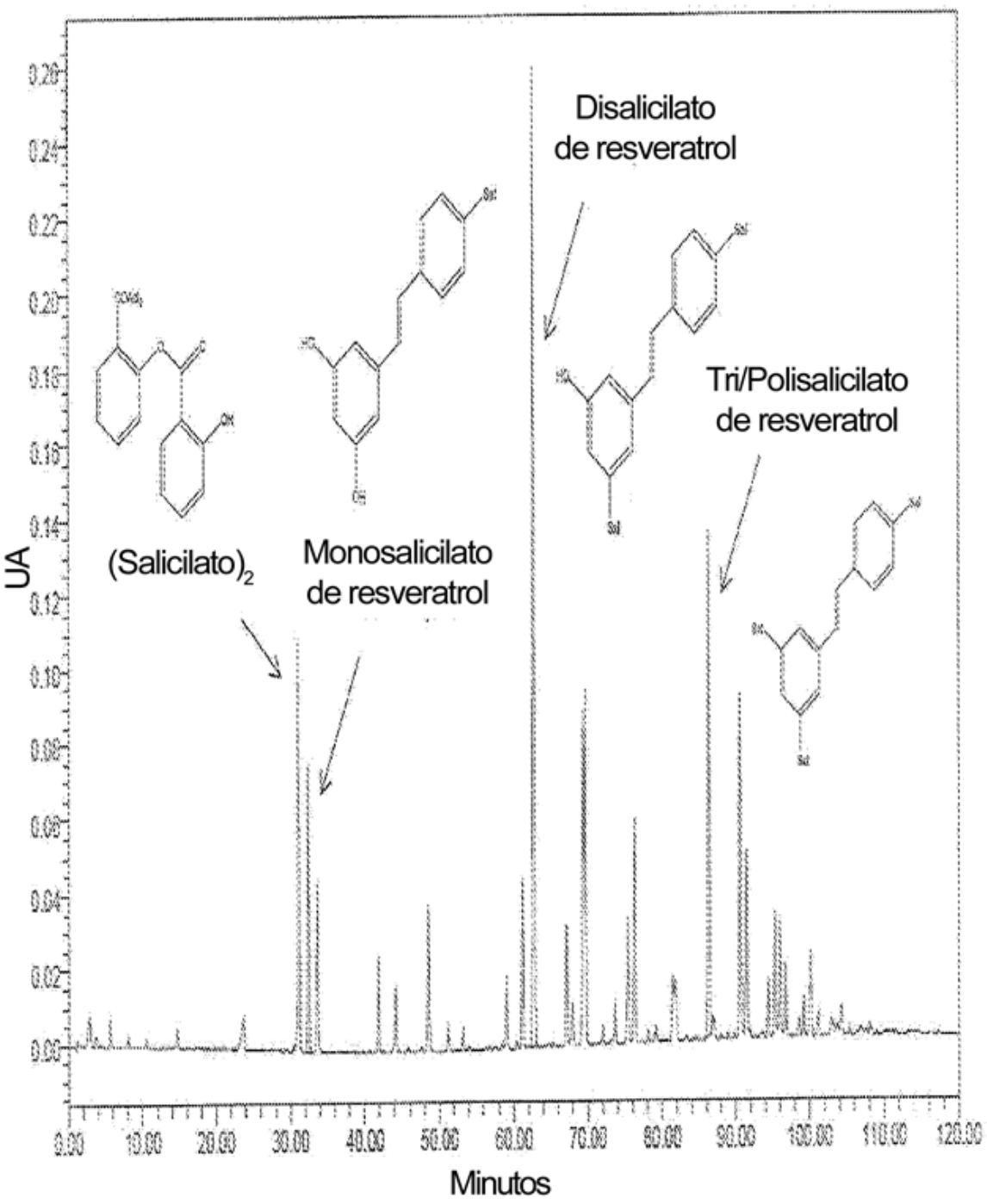


FIG. 20

Gradiente de HPLC

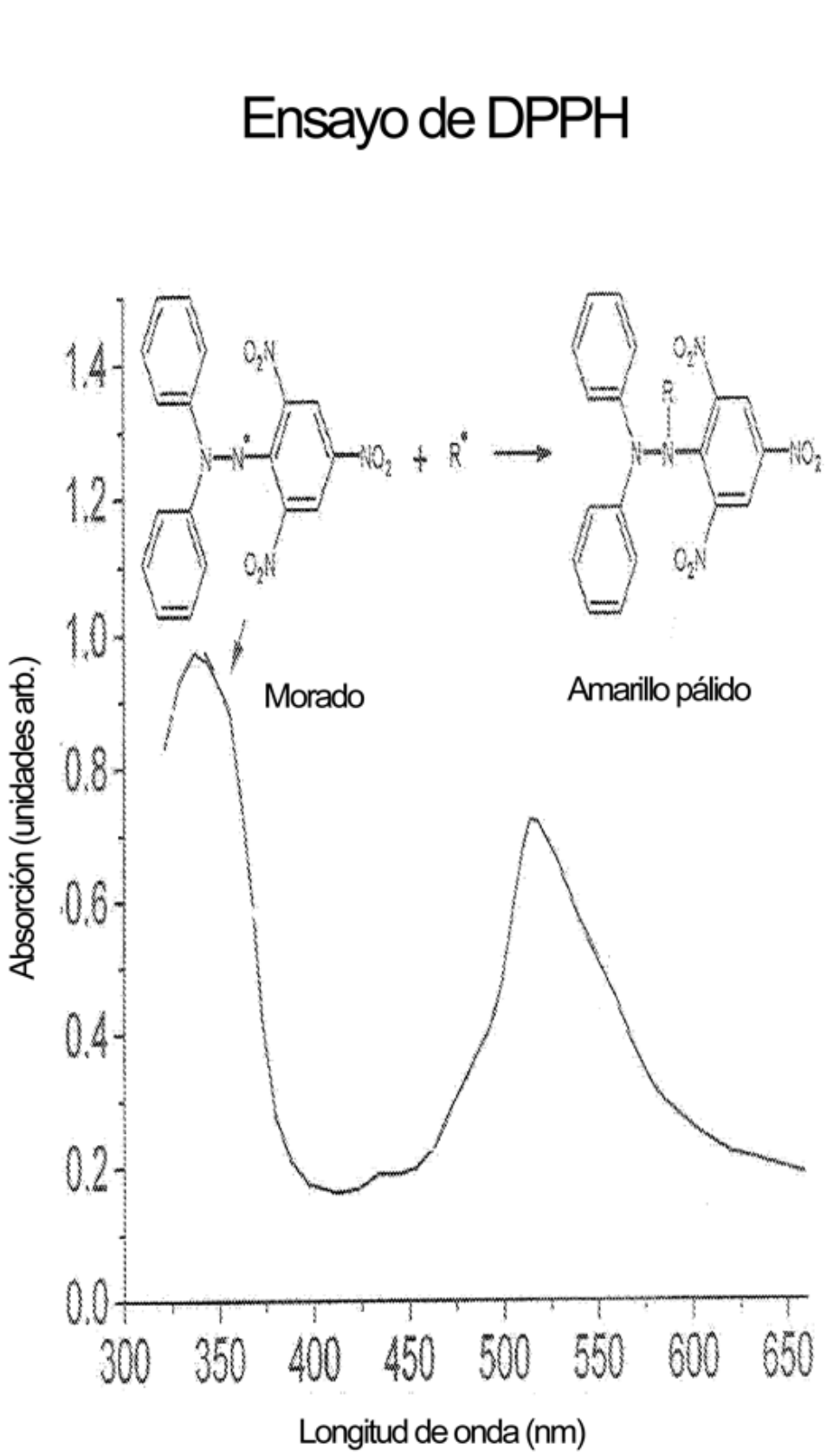


FIG. 21 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

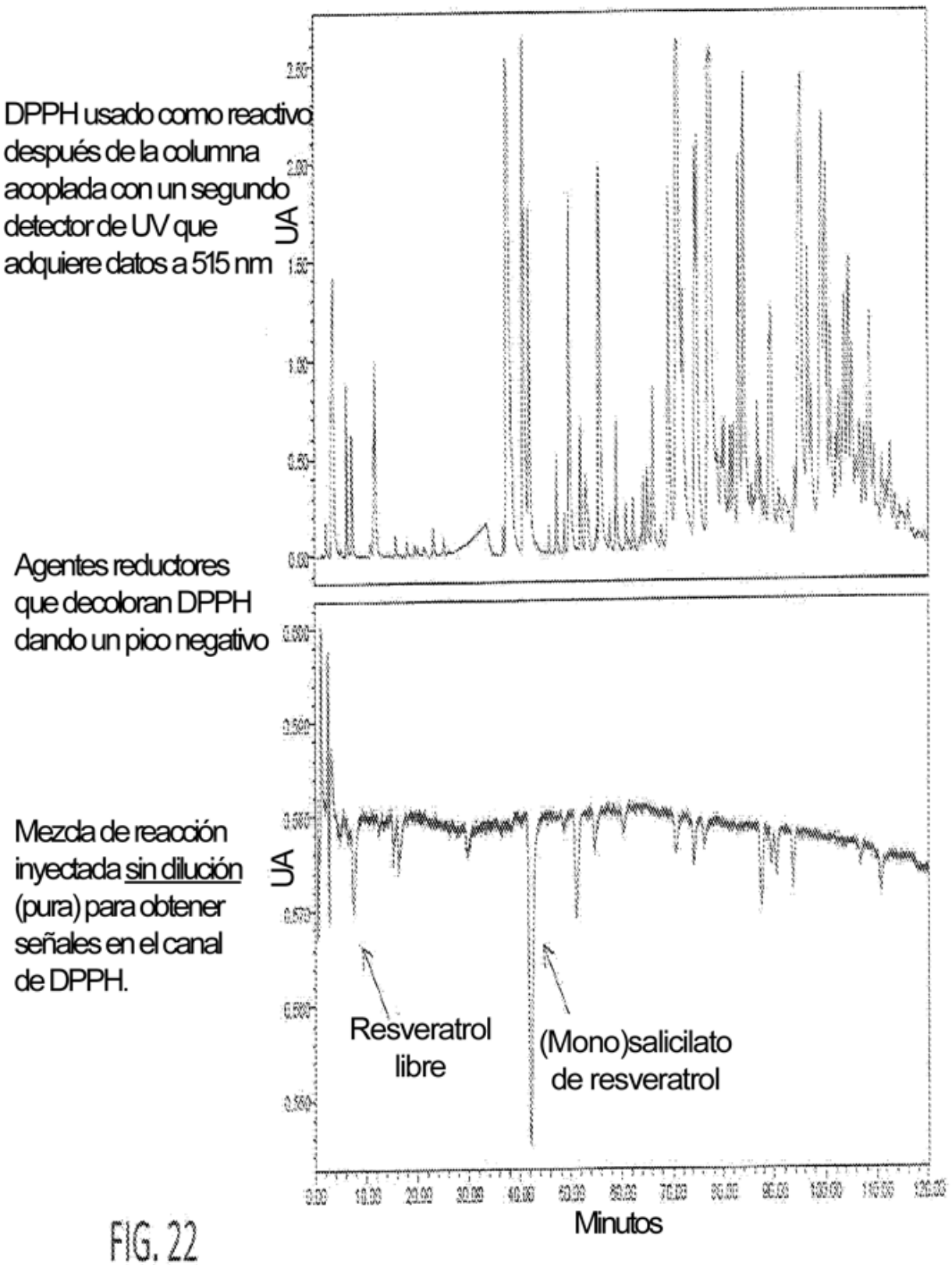
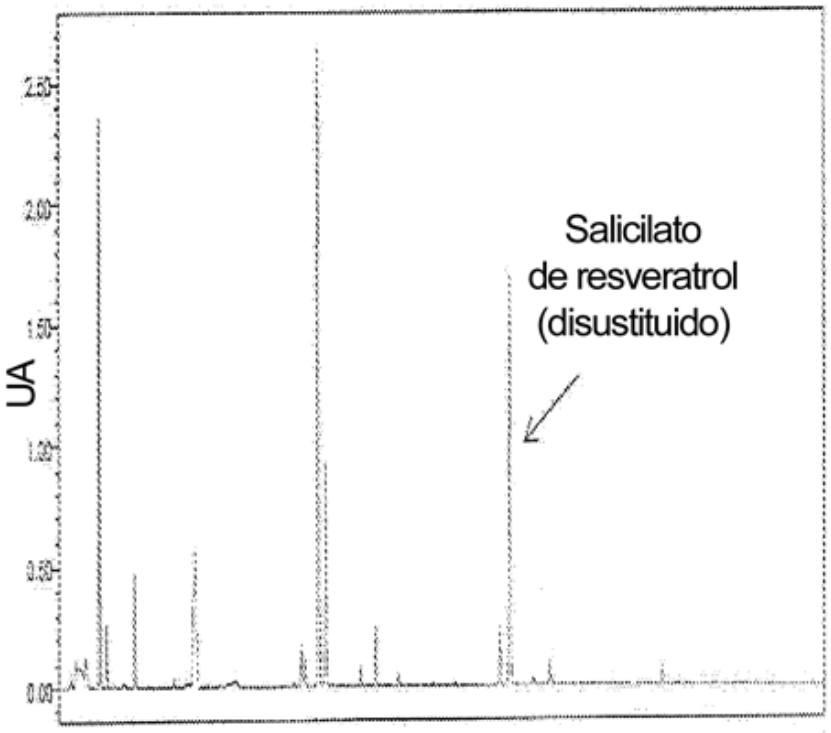

Detección en línea de antioxidantes
DPPH usado como reactivo después de la columna acoplada con un segundo detector de UV que adquiere datos a 515 nm
UA
Agentes reductores que decoloran DPPH dando un pico negativo
Mezcla de reacción inyectada sin dilución (pura) para obtener señales en el canal de DPPH.
UA
Resveratrol libre
(Mono)salicilato de resveratrol
Minutos

FIG. 22

DETECCIÓN EN LÍNEA DE ANTIOXIDANTES - HIDRÓLISIS LIMITADA

Mezcla de reacción hidrolizada durante aprox. 10 min con KOH 1 N; diluida 1:5



Obsérvese el aumento en resveratrol libre y salicilato de resveratrol monosustituido y la disminución global en complejidad.

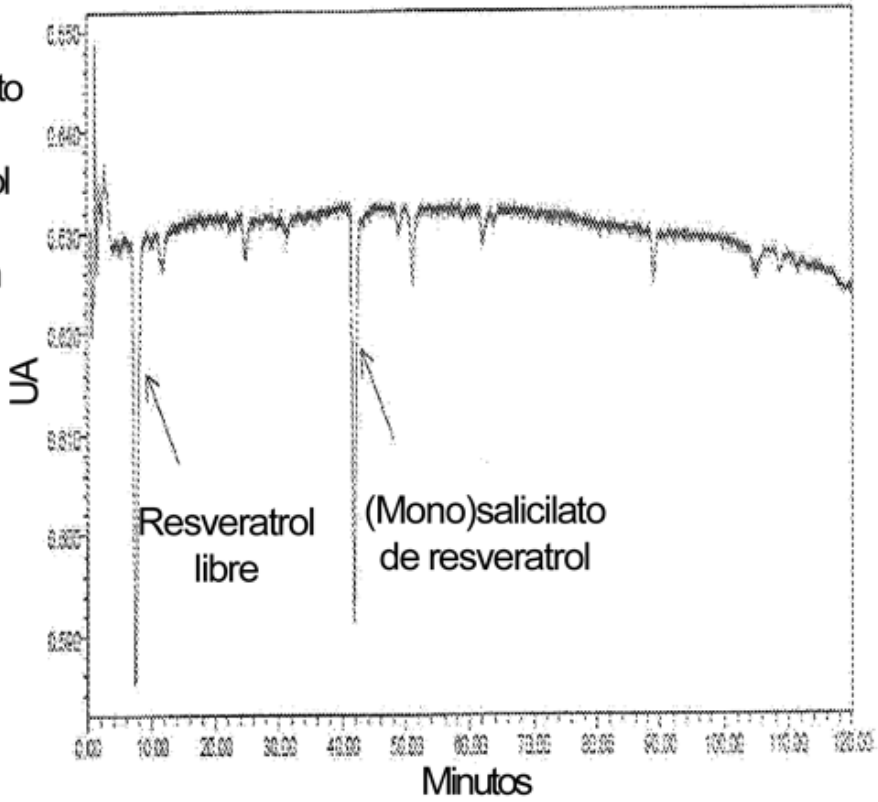


FIG. 23

DETECCIÓN EN LÍNEA DE ANTIOXIDANTES - HIDRÓLISIS LIMITADA

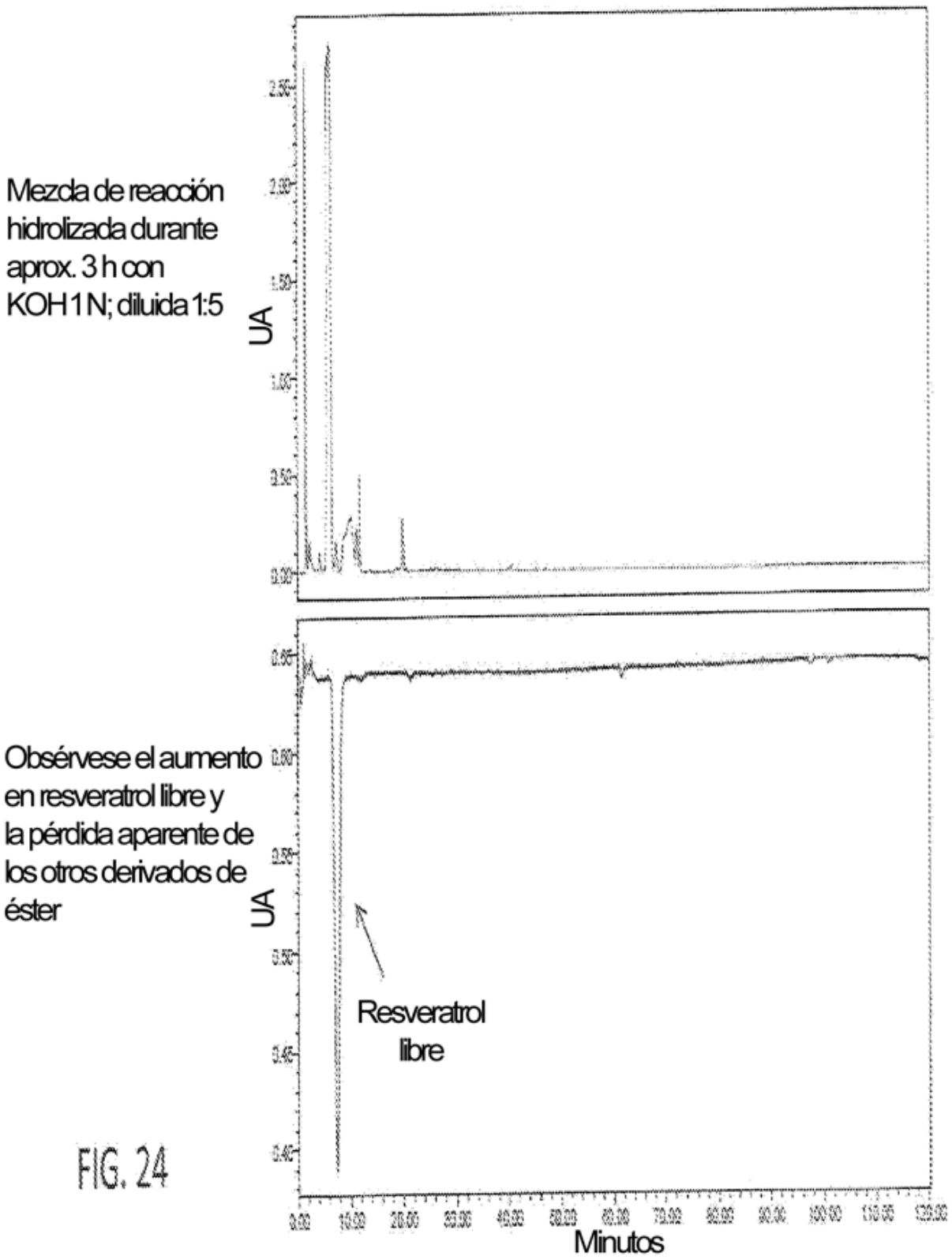


FIG. 24

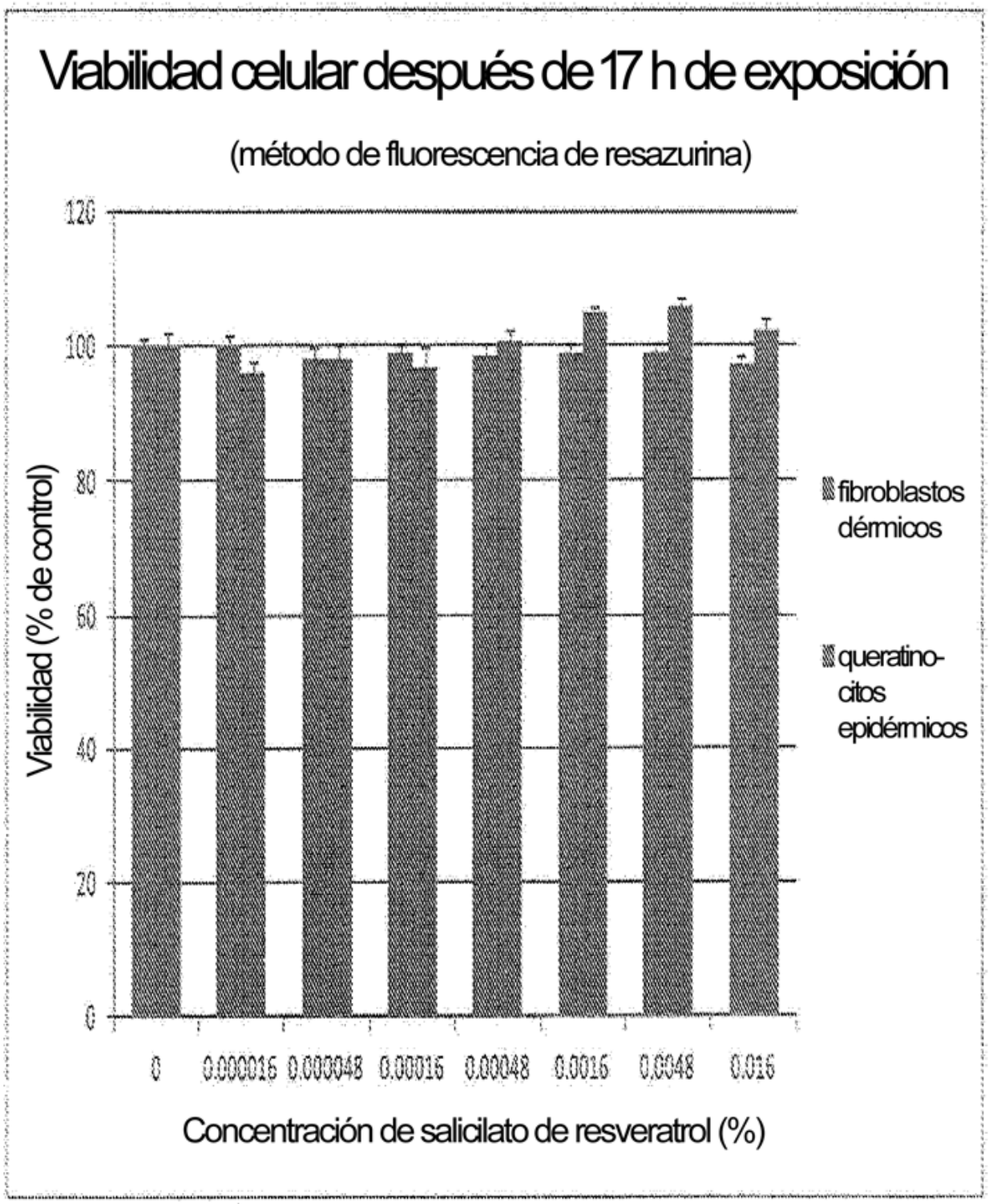

Viabilidad celular después de 17 h de exposición
(método de fluorescencia de resazurina)
Viabilidad (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
0
0.000016
0.000048
0.00016
0.00048
0.0016
0.0048
0.016
Concentración de salicilato de resveratrol (%)
fibroblastos dérmicos
queratino-citos epidérmicos

FIG. 25

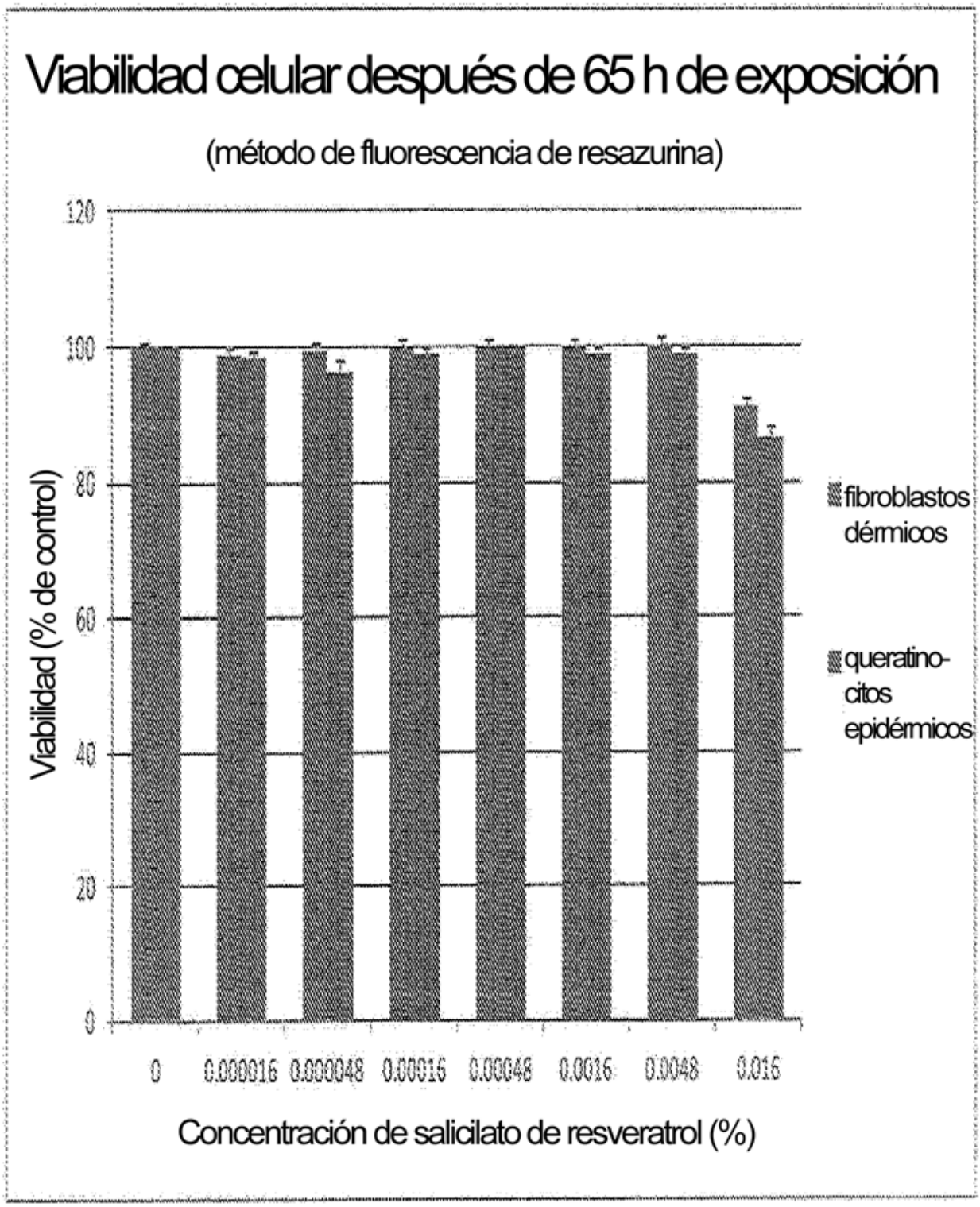

Viabilidad celular después de 65 h de exposición
(método de fluorescencia de resazurina)
Viabilidad (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
0
0.000016
0.000048
0.00016
0.00048
0.0016
0.0048
0.016
Concentración de salicilato de resveratrol (%)
fibroblastos dérmicos
queratino-citos epidérmicos

FIG. 26