

12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 17.09.01.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 21.03.03 Bulletin 03/12.

56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71) Demandeur(s) : PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE Société anonyme — FR.

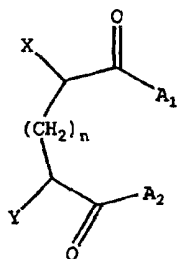
72) Inventeur(s) : REDOULES DANIEL, BORDAT PASCAL et PERIE JEAN JACQUES.

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

54) BIOPRECURSEURS DESTINES A UNE APPLICATION PERCUTANEE.

57) Bioprécurseur de formule (I)



dans laquelle

A₁ et A₂ représentent chacun indépendamment l'un de l'autre un radical provenant d'une molécule susceptible d'être utilisée en dermatologie ou en cosmétologie;

X et Y représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe hydroxy ou un groupe (C₁-C₂₀) alkyle; et

n représente un nombre entier compris entre 0 et 10.



La présente invention se rapporte à une composition
5 cosmétique ou pharmaceutique pour application cutanée,
contenant un composé apte à libérer deux molécules
actives (vitamines en particulier) par action d'une
activité estérasique contenue dans la peau, l'espaceur
pouvant introduire un effet additionnel (effet hydratant
10 d'hydroxy acide par exemple).

Il a été précédemment montré, à partir de deux
sources d'enzymes cutanées que cette enzyme était bien
capable de reconnaître et d'hydrolyser des esters
succiniques permettant ainsi un relargage lent de la
15 substance active, sans effet d'accumulation (M.P. Mora et
coll., *Chem Phys Lipids* (1999), **101**, 255-265, J. R.
Trevithick et coll., *Biochem. Mol. Biol. Int.* (1999), **47**,
509-511).

La stratégie des bioprécurseurs a été précédemment
20 utilisée pour la libération d'actifs, notamment dans les
cas qui suivent:

- libération de rétinol à partir de son ester avec
l'acide palmitique.

De nombreux composés sont utilisés en dermatologie,
25 parmi lesquels on retiendra:

- les agents hydratants ou plus précisément les agents
contrôlant la perspiration cutanée tels que les
saccharides (glucose, sorbitol, acide hyaluronique),
mais aussi le glycérol et les acides α -hydroxylés, ou
30 même les céramides d'origine végétale, hydratantes par
leur partie polaire. Parmi les hydroxy-acides, l'acide
L-ascorbique occupe une place de choix, puisqu'il

- associe à cette première propriété d'autres effets: un effet antioxydant et aussi la capacité à stimuler la synthèse du collagène (et donc des fibres élastiques) par une augmentation spécifique du taux d'ARNm codant
- 5 pour les trois chaînes pro- α . De plus, l'acide ascorbique active l'enzyme assurant la formation du collagène à partir du procollagène (S.R. Pinel et coll., *Arch. Dermatol.* (1987), **123**, 1684-1687);
- les agents antioxydants: on sait qu'ils sont
10 essentiels pour éviter la dégradation des lipides sous l'action des radicaux ainsi que les autres dommages pour les biomolécules de la surface cutanée, dommages conduisant à la formation des rides. Parmi les principaux pièges radicalaires, on trouve les
15 tocophérols, les flavonoïdes, l'acide ascorbique ainsi que les agents de chélation des métaux, qui bloquent les réactions d'oxydation catalysés par lesdits métaux;
 - les agents de contrôle de la différenciation: le plus
20 important est la vitamine A ou rétinol puisqu'une carence se traduit par une hyperkératinisation ainsi qu'une atrophie des glandes sébacées et sudorales. Le rétinol n'est pas utilisé comme tel mais après deux oxydations enzymatiques, la première réversible, le
25 transformant en rétinol, la seconde irréversible le transformant en acide rétinoïque qui est la forme active agissant sur les récepteurs nucléaires. Le stockage est assuré sous forme d'esters linoléique et palmitique. Un apport peut être assuré sous forme
30 d'esters ou sous forme de rétinol lié à un vecteur. On sait que l'action de l'acide rétinoïque est de plusieurs ordres: activateur du métabolisme cellulaire

et contrôle de la kératinisation, antioxydant et donc prévention de la formation des rides, action au niveau du derme sur le métabolisme des fibroblastes par deux effets: inhibition des enzymes dégradant le collagène (collagénases) et stimulation des glucosaminoglycanes qui augmentent la teneur en collagène et donc augmentation de l'élasticité de la peau;

- la vitamine D qui, outre son action sur le métabolisme phosphocalcique, exerce par l'intermédiaire de sa forme biologiquement active, le calcitriol, des effets sur la prolifération et la différenciation cellulaires. L'incubation de kératinocytes humains avec le calcitriol entraîne, en effet, une diminution de leur prolifération et l'induction de leur différenciation terminale (M F Holick et coll. *Arch. Dermatol.* (1987), **123**, 1677-1683). Le calcitriol est encore un immunosuppresseur puissant qui inhibe l'activation lymphocytaire et la production d'immunoglobulines (M Bagot et coll., *Br. J. Dermatol.* (1994), **130**, 424-431).

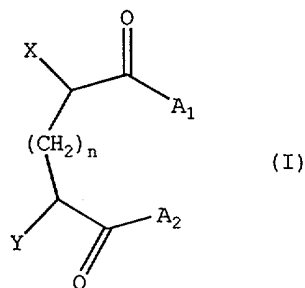
L'utilisation directe de ces dérivés par voie topique se heurte à un certain nombre de difficultés, du fait de leur manque de stabilité dans le temps et à la lumière, et d'effets secondaires (pro-oxydants et irritation) résultant souvent de sur-concentrations locales des molécules actives.

D'où l'intérêt d'améliorer la biodisponibilité d'actifs véhiculés sous forme d'un précurseur les associant et évitant ainsi leurs effets néfastes dus à l'accumulation.

Or, les inventeurs, après une recherche d'expression par les kératinocytes, d'une activité lipasique ou

cholestérol estérasique, ont identifié la lipase acide lysosomiale (*Human Lysosomal Acid Lipase* ou HLAL, Anderson R.A. et al., *J. Biol. Chem.*, **266**, 22479-84) et ont montré de manière surprenante que cette estérase
 5 était capable de couper certains précurseurs qui se présentaient sous forme d'actifs estérifiés.

En conséquence, la présente invention concerne un bioprécurseur de formule (I)



10 dans laquelle

A₁ et A₂ représentent chacun indépendamment l'un de l'autre un radical provenant d'une molécule susceptible d'être utilisée en dermatologie ou en cosmétologie et X et Y représentent indépendamment l'un de l'autre un
 15 atome d'hydrogène, un groupe hydroxy ou un groupe (C_1-C_{20}) alkyle; et
 n représente un nombre entier compris entre 0 et 10.

Au sens de la présente invention, on entend par composé susceptible d'être utilisé en dermatologie ou en
 20 cosmétologie, outre l'ensemble des agents définis dans la liste précédente, les antibiotiques comme par exemple le rétronidazole, l'érythromicine, la tétracycline et la clindamycine, les antibactériens, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les vitamines.

25 Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, la molécule susceptible d'être utilisée en dermatologie ou en cosmétologie présente une activité

anti-inflammatoire, antibactérienne, antibiotique ou vitaminique.

Dans un autre mode particulier de réalisation de l'invention A₁ et A₂ représentent chacun indépendamment l'un de l'autre un radical ascorbyle, cholécalciféryle, rétinyle, tocophéryle.

Dans un mode particulièrement avantageux de réalisation de l'invention, A₁ représente un radical tocophéryle et A₂ représente un radical choisi dans le groupe comprenant les radicaux rétinyle, cholécalciféryle et ascorbyle.

Dans un mode de réalisation encore plus avantageux selon l'invention, le composé de formule (I) est choisi dans le groupe constitué par le tocophéryl-rétinylsuccinate, le tocophéryl-cholécalcaldiféryl-succinate et le tocophéryl-ascorbyl-succinate.

La présente invention s'étend également à des compositions pharmaceutiques ou cosmétiques à usage topique contenant au moins un bioprécurseur de formule (I) associé à un véhicule approprié pour l'administration percutanée.

Conformément à la présente invention, lorsque ladite composition est appliquée sur la peau, le complexe subit une hydrolyse enzymatique de type estérase conduisant à la libération du principe actif, ledit principe actif étant libéré de façon retardée, sans effet d'accumulation dans les différentes couches de la peau.

Les compositions selon l'invention contiennent de 0,001 à 10% en poids, de préférence 0,01 % à 0,1% en poids, de bioprécurseurs par rapport au poids total de la composition.

Elles peuvent se présenter sous forme d'émulsion huile dans eau (H/E) ou eau dans huile (E/H). Elles peuvent encore se présenter sous forme de sphérules comme les liposomes, les nanocapsules ou les nanosphères.

5 Lorsque les compositions sont des émulsions, la proportion de la phase grasse va de 5 à 80 % en poids, de préférence de 5 à 50% en poids, par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les émulsionnants et les coémulsionnants utilisés dans ces compositions, sous
10 forme d'émulsion, sont choisis parmi ceux classiquement utilisés en cosmétique. L'émulsionnant et le co-émulsionnant sont présents, dans les compositions, en une proportion allant de 0,3 à 10% en poids, par rapport au poids total de la composition.

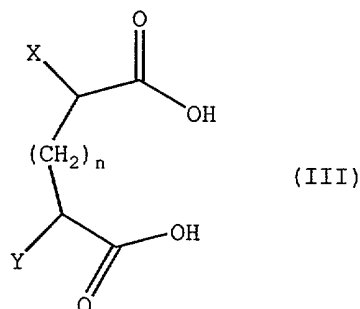
15 Les compositions selon l'invention peuvent également contenir des additifs cosmétiques ou dermatologiques acceptables. Ces additifs peuvent être, en particulier, des antioxydants, d'autres bioprécurseurs de ces antioxydants comme le δ -tocophérylglycopyranoside, des
20 tensioactifs, des corps gras, des agents hydratants, des conservateurs, des parfums, des gélifiants, des chélateurs, des pigments comme l'oxyde de titane, des filtres et des vitamines libres.

Les bioprécurseurs de formule (I) sont préparés par
25 des techniques connues de l'homme du métier.

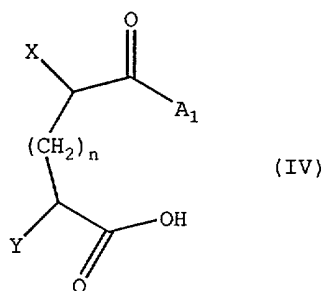
Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux du procédé, on fait réagir un composé de formule (II)



30 où A_1 est tel que défini précédemment, avec un composé de formule (III)



où X et Y sont tels que définis précédemment,
 dans un mélange contenant un solvant comme le
 dichlorométhane anhydre, la triéthylamine, II, III le
 5 dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et la
 diméthylaminopyridine (DMAP), on obtient un composé de
 formule (IV)



composé que l'on fait réagir dans les mêmes conditions
 10 que précédemment avec un composé de formule (V)



et on obtient le composé de formule (I).

Dans un autre mode de réalisation avantageux du
 procédé selon l'invention, on fait réagir le composé de
 15 formule (II) avec une forme activée du composé de formule
 (III), par exemple l'anhydride succinique.

Les avantages de cette stratégie des bioprécurseurs
 sont les suivants:

- stabilisation de l'actif grâce à la neutralisation de
 20 la fonction hydroxyle la plus réactive (vitamines D, E
 ou A). Du fait de l'importance de l'activité estérase
 dans les couches vivantes de l'épiderme et de sa quasi

absence dans la couche cornée (U.K. Jain et coll.,
Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.
(1995), **22**, 702-703), les précurseurs qui représentent
la forme stabilisée des principes actifs sont
5 préservés tout au long de la lente migration au
travers de la couche cornée laquelle correspond à la
partie la plus exposée au stress oxydatif (UV et
ozone) (G. Valacchi et coll., *FEBS Letters* (2000),
446, 165-168);

10 - libération avec une vitesse contrôlée (prise en compte
de la régulation très précise de la physiologie
cutanée) et effet réservoir.

De plus, on obtient une libération ciblée à partir
du stratum granulosum au niveau des membranes plasmiques
15 des kératinocytes (M.P. Mora et coll., *Chem. Phys. Lipids*
(1999), **101**, 255-265), c'est-à-dire dès que débute la
partie vivante de l'épiderme.

Le précurseur, après migration dans les premières
couches de l'épiderme vivant c'est à dire au niveau du
20 stratum granulosum, est reconnu en tant que pseudo-
substrat par l'activité estérase impliquée, responsable
de l'hydrolyse des deux fonctions ester. Deux effets
conjugués, additifs voire synergiques, sont ainsi obtenus
à partir d'une formulation unique, cette dernière
25 facilitant la migration.

Ainsi, l'association tocophérol-acide ascorbique est
particulièrement intéressante, puisque ce dernier
régénère le tocophérol après son oxydation, augmentant
ainsi son efficacité d'antioxydant.

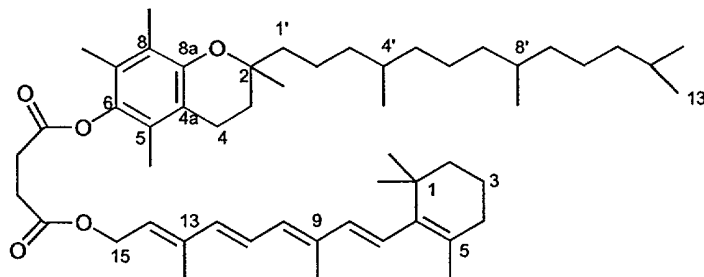
30 La structure des précurseurs selon l'invention
assure une bonne stabilité tout au long de la traversée
de la couche et une libération au niveau des couches

vivantes de l'épiderme des actifs avec une cinétique assurant une coupure effective et un effet avec rémanence dans le temps.

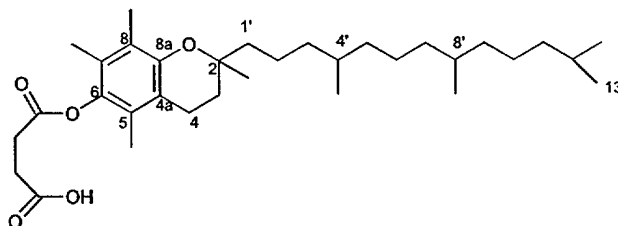
La pénétration à travers la peau est liée au Kd des
 5 composés (Agache P. et coll., Ed. Tech. Encycl. Méd. Chir. (1995), 12-235-C-30, 1-10); or, la structure des précurseurs selon l'invention permet également de moduler la pénétration des actifs pseudosubstrats grâce à la présence de X et Y qui représentent soit des groupes
 10 hydroxy donc hydrophiles, soit des groupes (C₁-C₂₀)alkyle donc lipophiles qui permettent d'obtenir un composé amphiphile susceptible de pénétrer en quantité appréciable par diffusion passive.

15 Les exemples qui suivent illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

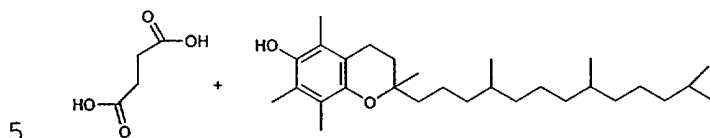
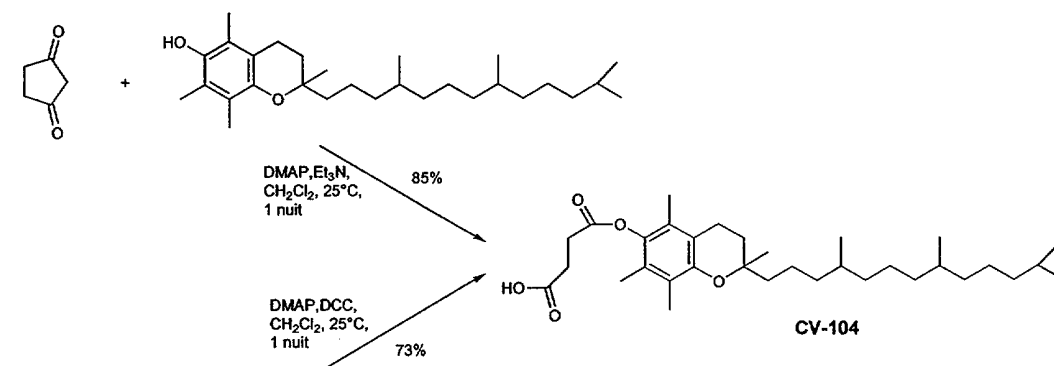
Exemple 1: O-(4-oxo-4-[[2,5,7,8-tetraméthyl-2-(4,8,12-triméthyltridécyloxy)-3,4-dihydro-2H-chromen-6-yl]oxy]butanoyle)retinol ou tocophéryl-rétinyl-succinate (CV-105).



1.1. Méthyl 2,5,7,8-tetraméthyl-2-(4,8,12-triméthyltridécyloxy)-3,4-dihydro-2H-chromen-6-yl succinate (CV-104).



Deux méthodes de synthèse ont été développées soit à partir de l'anhydride succinique, soit de l'acide succinique.



Selon la première méthode, l' α -tocophérol ou vitamine E (2,15 g, 5 mmol), l'anhydride succinique (750 mg, 7,5 mmol, 1,5 eq) sont dissous dans 20 ml de dichlorométhane (CH_2Cl_2) anhydre. La diméthylamino-pyridine (DMAP) (305 mg, 2,5 mmol, 0,5 eq) et la triéthylamine anhydre (0,7 ml, 1 eq) y sont rajoutés et la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) (Et_2O /ether de pétrole (EP) 2:3 ou acétate d'éthyle/EP 1:1). La réaction est en général finie au

10

15

bout d'une nuit de réaction, le mélange est donc filtré puis lavé avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 5% aqueux. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée pour donner une huile jaune (3 g environ) à purifier.

Selon la deuxième méthode, l'acide succinique (590 mg, 5 mmol), le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1,03 g, 1 eq) et le DMAP (61 mg, 0,5 mmol, 10%) sont dissous dans 20 ml de CH₂Cl₂ anhydre aux ultrasons pendant 10-15 minutes puis l' α -tocophérol ou vitamine E (2,15 g, 5 mmol, 1 eq) en solution dans 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre y est additionné. La réaction est suivie par CCM (Et₂O/EP 2:3 ou AcOEt/EP 1:1). Le mélange est donc filtré puis lavé avec HCl 5% aqueux, la phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée pour donner une huile jaune à purifier.

Dans les deux cas le produit est purifié par flash-chromatographie (colonne 2,5 cm x 16 cm, éluant Et₂O/EP 2:3, fractions de 10-15 ml). Le dépôt de l'huile pâteuse peut être fait en dépôt solide ou dans CH₂Cl₂. La première méthode conduit à 2,26 g de CV-104 pur, soit 85% de rendement et la seconde à 1,95 g, soit 73% de rendement d'une huile jaune pâle qui durcit à -20°C et peut donner une poudre blanche.

Rf (Et₂O/EP 2:3): 0,39.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): 2,87 (dt, 4H, H-(C_{ac succ}), ²J=21, ³J=6,6) ; 2,58 (t, 4H, H-(C₄, C₃), ³J=6) ; 2,08, 2,01, 1,97 (3s, 9H, CH₃-(C₅), CH₃-(C₇), CH₃-(C₈)), 1,6-1 (gros multiplet, 24H, CH₃-(C₁) + 9 x CH₂, 3 x CH tocophérol), 0,88, 0,84 (2s, 12H, 4 x CH₃ tocophérol).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) : 177,51, 170,96 (s, C=O acide + C=O ester) ; 149,48 (s, C_{8a}) ; 140,44 (s, C₆) ; 126,73 (s, C₇) ; 125,00 (s, C₅) ; 123,10 (s, C₈) ; 117,45 (s, C_{4a}) ; 75,11 (s, C₂) ; 39,42 (t, C_{1'}) ; 37,45 (t, C_{7'} + C_{9'} + C_{3'} + C_{5'} + C_{11'}) ; 32,83 (d, C_{8'} + C_{4'} + C_{12'}) ; 28,97, 28,68, 24,88, 24,50, 21,08, 20,64 (C_{10'} + C_{6'} + C_{2'} + C₄ + CH₂ ac succ) ; 28,04 (CH₃-(C₂)) ; 22,69 (C_{13'}) ; 19,74, 12,7,

12,18, 12,10, 11,99 (CH-(C_{12'} + C_{8'} + C_{4'}) + CH₃-(C₈ + C₇ + C₅) + CH₃-(C₁)).

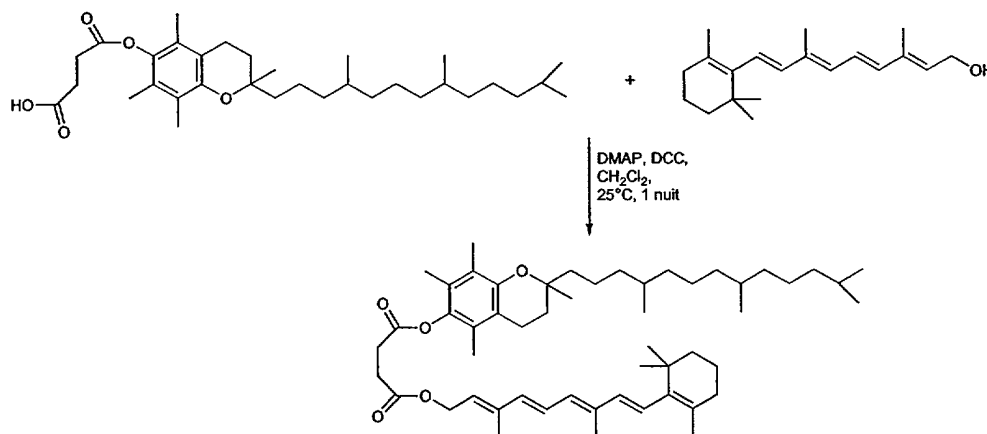
IR (NaCl): 2924, 2856, 2735, 2638, 2540, 1746, 1694, 1455, 1421, 1378, 1323, 1246, 1155, 1106, 919, 853 ,
5 799, 728.

MS (CI, NH₃): 548 ([MNH₄]⁺, 100) ; 531 ([MH]⁺, 11.3) ; 530 ([M]⁺, 3,4).

UV (CH₃CN): 286 (0,047 à 14 µg/ml) ; 203 (0,61 à 14 µg/ml).

10 EA pour C₃₃H₅₄O₅ (530,78): calc. C 74,67, H 10,25; exp. C 74,85, H 10,26.

1.2. Tocophéryl-rétinyl-succinate (CV-105)



CV-105

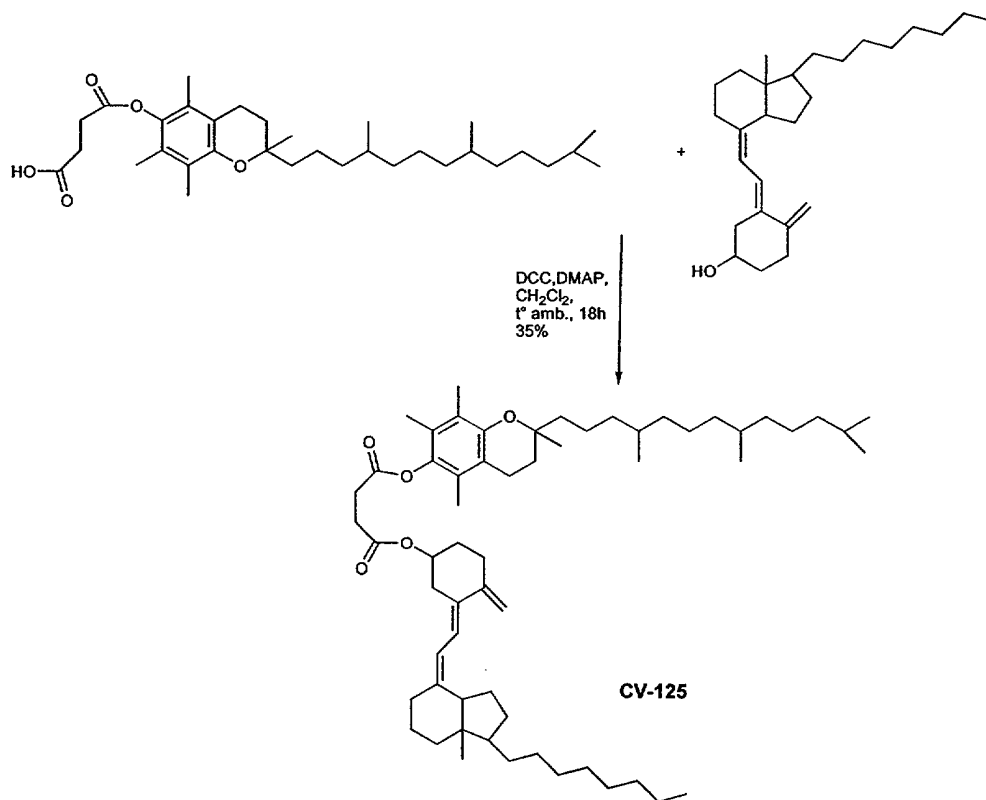
15 CV-104 préparé à l'exemple 1.1 (356 mg, 0,67 mmol) est dissous dans 20 ml de CH₂Cl₂ anhydre, le DCC (138 mg, 1 eq), le DMAP (20 mg) y sont rajoutés directement. Après 10 minutes il se forme déjà un précipité de dichlorohexylurée (DCU), l'anhydride de CV-104 ayant dû
20 se former. Après 20 minutes le rétinol-vitamine A (192 mg, 1 eq) en solution dans 5 ml de CH₂Cl₂ anhydre est rajouté. La réaction conduite à l'abri de la lumière est suivie en CCM (CH₂Cl₂ /EP 2:3), un nouveau produit moins

polaire se forme. Après une nuit de réaction, le solvant est filtré puis évaporé. Le produit est purifié sur flash chromatographie avec AcOEt/EP (2:3) et on obtient une huile jaune (266 mg-50% rendement). Une deuxième
 5 purification est faite en HPLC (20 g silice 35, éluant Et2O/ EP 1:9).

A partir de 130 mg du premier lot purifié, 72 mg d'une huile translucide (CV-105) sont obtenus, soit 28% de rendement.

10

Exemple 2: Tocophéryl-colecalciferyl-succinate (CV-125)



CV-104 préparé à l'exemple 1.1 (423 mg, 0,798 mmol) est dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre, le DCC (181 mg, 1,1 eq), le DMAP (20 mg) y sont rajoutés directement.
 15 Après 20 minutes la vitamine D₃ (307 mg, 1 eq) en solution dans 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre est rajoutée. La

réaction conduite à l'abri de la lumière est suivie en CCM (AcOEt /EP 2:8 ou 5:95), un nouveau produit moins polaire se forme. Après une nuit de réaction, le solvant est filtré puis évaporé. Le produit purifié sur flash chromatographie avec AcOEt/EP (5:95) comme éluant, colonne 2 x 12 cm, fraction de 6-8 ml.

Les fractions 4 à 10 sont évaporées pour conduire à 253 mg d'une huile translucide de tocophéryl-calciféryl-succinate (CV-125) (35% de rendement).

- 10 Rf (AcOEt/EP 2:8): 0,91; (AcOEt/EP 5:95): 0,32.
 RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): 6,22 (d, 1H, H-(C₇), ³J₇₋₈=11,2); 6,04 (d, 1H, H-(C₈), ³J₈₋₇=11,2); 5,07 (s, 1H, CH₂-(C₄)); 4,98 (m, 1H, H-(C₁)); 4,85 (d, 1H, CH₂-(C₄)); 2,92 (dd, 2H, CH₂-succ, ²J=16, ³J=6,8); 2,75 (m, 3H, CH₂-succ + CH-
- 15 (C₄), ²J=16, ³J=6,8); 2,60 (m, 2H, CH-(C₆)+CH-(C₄)); 2,4 (m, 2H, CH-(C₆)+H-(C₁₇)); 2,09, 2,03, 1,99 (3s, 9H, CH₃-(C₅), CH₃-(C₇), CH₃-(C₈)), 1.,3-0,9 (gros multiplet, 47H, 11 x CH₂-vitE, 3 x CH-(C_{12'}, C_{4'}, C_{8'})+11x CH₂-vitD₃); 0,89 et 0,87 (2s, 21H, 4 x CH₃-(C_{12'}, C_{4'}, C_{8'})+C₂₅); 0,55 (s, 3H,
- 20 CH₃-(C₁₃)).
 RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): 171,72, 171,07 (s, 2 x C=O ester); 149,47 (s, C₅); 144,64 (s, C₆); 142,55 (s, C_{8a}); 140,50 (s, C₉); 134,23 (s, C₄); 126,76 (s, C₇); 125,00 (s, C₅); 123,06 (s, C₈); 122,61 (d, C₇); 117,53 (d, C₈); 117,38
- 25 (s, C_{4a}); 112,81 (t, CH₂-(C₄)); 75,08 (s, C₂); 72,28 (d, C₁); 56,66 (d, C₁₇); 56,43 (d, C₁₄); 45,97 (s, C₁₃); 42,19 (t, C₁₂); 36,20, 32,84, 32,77 (d, C_{8'}+C_{4'}+C_{12'}); 40,62, 39,57, 39,44, 37,47, 32,23, 31,99, 31,12, 29,50, 29,12, 28,96, 28,08, 27,76 (t, C_{1'}+C₃+C₇+C₉+C_{3'}+C₅+C₁₁+C₁₅+C₁₀+C₆
- 30 +C₂+C₃+C₁₈₋₂₃+2 x CH₂ ac succ), 24,89, 24,52, 23,95, 23,64, 22,29, 21,11, 20,67 (t, C_{10'}+C_{6'}+C_{2'}+C₄+C₂₄+C₁₆+C₁₁); 22,91, 22,81, 22,71 (q, CH₃-(C₂+2 x C_{13'})); 19,76, 18,92, 13,05,

12,19, 12,05, 11,89 (q, $\text{CH}_3-(\text{C}_8+\text{C}_4)+\text{CH}_3-(\text{C}_8+\text{C}_7+\text{C}_5)+\text{C}_{25}+\text{CH}_3-(\text{C}_2)$).

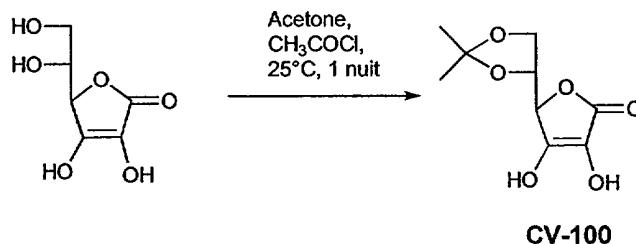
IR (NaCl): 2950, 2867, 2119, 1758, 1736, 1463, 1412, 1377, 1240, 1202, 1146, 1110, 1079, 996, 734.

5 MS (CI, NH_3): 914 ($[\text{MNH}_4]^+$, 100); 897 ($[\text{MH}]^+$, 2,86) ; 896 ($[\text{M}]^+$, 2,71).

EA pour $\text{C}_{60}\text{H}_{96}\text{O}_5$ (896): calc. C 80,30, H 10,78; exp. C 77,36, H 10,26.

10 **Exemple 3: Tocophéryl-ascorbyl-succinate (CV-106)**

3.1. Vitamine C protégée (CV-100)



A une suspension de vitamine C ou acide ascorbique (3g, 17 mmol) dans 30 ml d'acétone sont ajoutés 250 μl de chlorure d'acide acétique. La solution devient limpide
 15 puis un précipité blanc se forme. Après une nuit de réaction le précipité est filtré puis rincé à l'acétate d'éthyle glacé. La poudre obtenue est ensuite séchée pour donner 2,96 g (13,7 mmol) de vitamine C protégée (CV-
 20 100), soit 80,6% de rendement.

3.2. Tocophéryl-ascorbyl-succinate (CV-106)

Le produit est purifié par HPLC (30 mg) colonne silice 15-25, éluant CH₂Cl₂/AcOEt/NEt₃ (9:1:0,5%) puis CH₂Cl₂/AcOEt/NEt₃/MeOH (9:1:0,5%:2%).

Aspect: poudre mousseuse blanche

5 Rf (AcOEt/CH₂Cl₂/MeOH 1:8:1): 0,38; (AcOEt/CH₂Cl₂/MeOH 1:8:2): 0,48.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): 4,66 (d, 1H, C₄ vitc); 4,39 (ddd, 1H, C₅ vitc); 4,1 (td, 2H, C₆ vitc, ³J₆₋₅=7,2, ²J_{6-6'}=19); 2,92, 2,76 (2t, 4H, H-(C_{ac} succ), ³J=6,6); 2,58 (t, 2H, H-(C₄), ³J=6); 2,08, 2,0, 1,97 (3s, 9H, CH₃-(C₅), CH₃-(C₇), CH₃-(C₈)); 1,8-1,7 (m, 2H, H-(C₃)); 1,7-1,09 (gros multiplet, 23H, 10 x CH₂, 3 x CH tocophérol,); 0,87, 0,85 (2s, 12H, 4 x CH₃ tocophérol).

15 RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): 171,65, 171,12 (s, 2 x C=O ester); 159,12 (s, C₃ vitc); 149,61 (s, C₆); 140,46 (s, C_{8a}); 126,58 (s, C₇); 124,89 (s, C₅); 123,16 (s, C₈); 117,54 (s, C_{4a}); 114,39 (s, C₂ vitc); 110,57 (s, C₇ vitc); 75,16 (s, C₂); 75,10 (d, C₄ vitc); 73,68 (d, C₅ vitc); 65,32 (t, C₆ vitc); 39,43 (t, C_{1'}); 37,46 (t, C₃); 32,84, 32,76, 29,00 (d, C₈+C₄+C_{12'}); 31,09, 29,78, 28,99, 28,90, 28,70, 28,57, 24,88, 24,51, 21,09, 20,65 (t, C₇+C₉+C₃+C₅+C₁₁+C₁₀+C₆+C₂+C₄+2 x CH₂ ac succ); 25,86, 25,61 (q, C_{8et} 8' vitc); 21,09, 20,65 (q, CH₃-(C₂)+2 x C_{13'}); 22,81, 22,72, 13,00, 12,15, 11,89 (q, CH₃-(C₈+C₄)+CH₃-(C₈+C₇+C₅)).

25 IR (NaCl): 3248, 2929, 2856, 1756, 1670, 1605, 1453, 1409, 1374, 1322, 1256, 1213, 1141, 1066, 885, 852, 820, 736, 700.

MS (CI, NH₃): 746 ([MNH₄]⁺, 96); 728 ([M]⁺, 2.6); 612 (6.7); 548 [MNH₄]⁺ de CV-104 (20.3); 423 (16); 234 [MNH₄]⁺ de CV-100 (59).

EA pour C₄₂H₆₄O₁₀ (728): calc. C 69,20, H 8,85; exp. C 67,17, H 8,83.

Exemple 4: Hydrolyse enzymatique**4.1. Mode opératoire**

Sur une boîte contenant une lignée de kératinocytes HaCaT (75 cm²) dans 15 ml de sérum seul on dépose 150 µl de solution 1 mM dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Les cellules sont placées dans l'incubateur à 37°C pendant 24 heures. On procède à l'extraction du milieu par 15 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite isolée et évaporée.

Les cellules sont extraites par sonication dans 2 x 15 ml d'un mélange glacé constitué de chloroforme et de méthanol (1:2,5). Après centrifugation la phase organique prélevée est évaporée à sec. Pour chaque essai un contrôle est réalisé sur une boîte contenant des cellules et un milieu sans substrat pour tenir compte d'une éventuelle dégradation chimique du substrat.

La présence d'une activité estérase dans les kératinocytes humains est vérifiée grâce à un substrat, le 4-méthyl-umbelliféryl-palmitate. Le précurseur selon l'invention, utilisé comme pseudo-substrat, est le tocophéryl-rétinyl-succinate préparé selon l'exemple 1.

4.2. Résultats

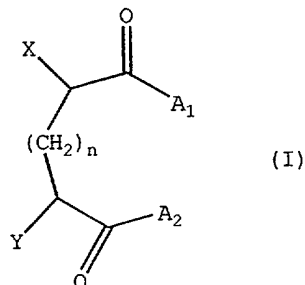
Ils sont rassemblés dans le tableau qui suit:

Substrat	Taux d'hydrolyse en 24 heures d'incubation	Partie libérée
4-méthyl-umbelliféryl-palmitate	2,7 % ± 2%	4-méthyl-umbelliférone
Tocophéryl-rétinyl-succinate	5 % ± 3%	vitamines A et E

Les valeurs obtenues montrent une libération simultanée des vitamines E et A à partir du tocophérylrétinyl-succinate. Ces résultats confirment une très bonne cinétique de coupure dans les cas d'esters succiniques par les estérases kératinocytaires. De plus, 5 on constate une libération avec effet réservoir puisqu'on retrouve dans la prise d'essai, le précurseur non dégradé.

REVENDICATIONS

1. Bioprécurseur de formule (I)



5 dans laquelle
 A₁ et A₂ représentent chacun indépendamment l'un de
 l'autre un radical provenant d'une molécule susceptible
 d'être utilisée en dermatologie ou en cosmétologie;
 X et Y représentent indépendamment l'un de l'autre un
 10 atome d'hydrogène, un groupe hydroxy ou un groupe
 (C₁-C₂₀)alkyle; et
 n représente un nombre entier compris entre 0 et 10.

2. Bioprécurseur selon la revendication 1,
 15 caractérisé en ce que la molécule susceptible d'être
 utilisée en dermatologie ou en cosmétologie présente une
 activité anti-inflammatoire, antibactérienne,
 antibiotique ou vitaminique.

20 3. Bioprécurseur selon l'une quelconque des
 revendications 1 ou 2, dans laquelle:
 A₁ et A₂ représentent chacun indépendamment l'un de
 l'autre un radical ascorbyle, cholécalciféryle, rétinyle,
 tocophéryle.

25

4. Bioprécurseur selon la revendication 3,
 caractérisé en ce que A₁ représente un radical

tocophéryle et A₂ représente un radical choisi dans le groupe comprenant les radicaux rétinyle, cholécalciféryle et ascorbyle.

5 5. Bioprécurseur selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par le tocophéryl-rétinyl-succinate, le tocophéryl-cholécalciféryl-succinate et le tocophéryl-ascorbyl-succinate.

10

6. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un bioprécurseur selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, associé à un véhicule approprié pour l'administration percutanée.

15

7. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 6, caractérisées en ce qu'elles contiennent de 0,001 à 10% en poids, de préférence de 0,01 à 0,1% en poids, de bioprécurseurs par rapport au poids total de la composition.

20

8. Compositions pharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 6 et 7, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme d'émulsion huile dans eau (H/E) ou eau dans huile (E/H).

25

9. Compositions pharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 6 et 7, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme de sphérules.

30

10. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 8, caractérisées en ce que la proportion de la phase grasse va de 5 à 80% en poids, de préférence de 5 à 50% en poids, par rapport au poids total de la composition.

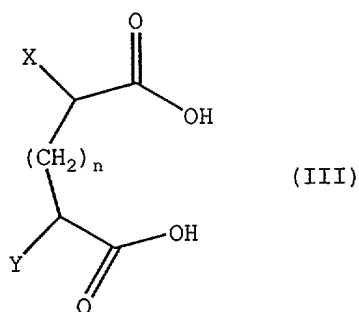
11. Compositions pharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisées en ce qu'elles contiennent en outre des additifs cosmétiques ou dermatologiques acceptables.

12. Procédé de préparation des bioprécurseurs selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on fait réagir un composé de formule (II)

15

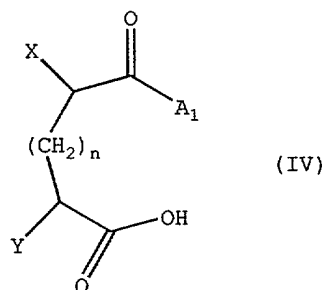


où A_1 est tel que défini dans la revendication 1, avec un composé de formule (III)



20 où X et Y sont tels que définis dans la revendication 1, dans un mélange contenant un solvant comme le dichlorométhane anhydre, la triéthylamine, II, III le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et la diméthylaminopyridine (DMAP), on obtient un composé de formule (IV)

25



composé que l'on fait réagir dans les mêmes conditions que précédemment avec un composé de formule (V)



5 et on obtient le composé de formule (I).

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 608651
FR 0111982

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 109, no. 30, 1988 Columbus, Ohio, US; abstract no. 73692f, page 719; XP002201606 * abrégé * & JP 06 287470 A (ARAKAWA) 11 octobre 1994 (1994-10-11) ---	1,3-6, 11,12	C07C69/40 A61K47/14 A61K7/48 A61P31/04 A61P29/00
X	WO 00 61189 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, CANADA) 19 octobre 2000 (2000-10-19) * le document en entier * ---	1-3,6, 11,12	
X	FR 2 722 094 A (JCB COSMETIQUES) 12 janvier 1996 (1996-01-12) * page 1 - page 7 * ---	1,2,6,11	
X	C.DUVAL: "SCAVENGER EFFECT OF VITAMIN E" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 84, no. 1, janvier 1995 (1995-01), pages 107-110, XP002201605 USA * page 107 - page 108 * ---	1	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C07D A61K
A	---	2-6,11	
A	WO 00 58325 A (PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE) 5 octobre 2000 (2000-10-05) * le document en entier * -----	1-12	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 juin 2002		Francois, J	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0111982 FA 608651**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 10-06-2002
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
JP 6287470	A	11-10-1994	AUCUN		
WO 0061189	A	19-10-2000	US	6045826 A	04-04-2000
			AU	2273400 A	14-11-2000
			BR	0009532 A	26-12-2001
			WO	0061189 A2	19-10-2000
			EP	1159006 A2	05-12-2001
			FI	20011914 A	19-11-2001
			NO	20014780 A	27-11-2001
			US	6191172 B1	20-02-2001
FR 2722094	A	12-01-1996	FR	2722094 A1	12-01-1996
WO 0058325	A	05-10-2000	FR	2791679 A1	06-10-2000
			AU	3664200 A	16-10-2000
			EP	1163249 A1	19-12-2001
			WO	0058325 A1	05-10-2000