

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 651**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/455** (2006.01)

**A61K 31/355** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61P 17/10** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61P 17/18** (2006.01)

**A61K 47/00** (2006.01)

**A61K 8/67** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2021 PCT/IB2021/059248**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2022 WO22074622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2021 E 21802416 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 4225299**

54 Título: **Derivados de tocotrienoles, procedimientos y utilización de los mismos**

30 Prioridad:

**08.10.2020 EP 20200872**

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

**16.12.2024**

73 Titular/es:

**GLOBAL SCIENTIFIC (100.0%)  
100 North Arlington Avenue Suite 200, Unit 10  
Reno, Nevada 89501, US**

72 Inventor/es:

**KERN, DANIEL;  
MIRKHANI, KENT;  
ASCENSÃO AROSO, IVO MANUEL;  
DE SÁ BESSA, RICARDO y  
GONÇALVES DOS REIS, RUI LUIS**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 992 651 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

Derivados de tocotrienoles, procedimientos y utilización de los mismos

5 **Sector técnico**

La presente invención se refiere a la utilización de tocotrienoles estabilizados en la industria médica, veterinaria o cosmética. En particular, a la utilización de tocotrienoles estabilizados en la prevención, terapia o tratamiento de enfermedades o trastornos de la piel, tales como acné, dermatitis seborreica, rosácea o como agente antienvjecimiento.

**Estado de la técnica anterior**

La vitamina E se refiere a los tococromanoles, un grupo de ocho moléculas con una estructura química similar: cuatro tocoferoles, consistiendo cada uno de los cuales en una cadena saturada (fitilo) unida a un anillo de cromanol que difiere en el nivel de metilación ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ); y cuatro tocotrienoles, consistiendo cada uno de los cuales en una cadena lateral insaturada (fitilo) unida a un anillo de cromanol que difiere en el nivel de metilación ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). La vitamina E se encuentra de forma natural en todas las especies de plantas y en algunas cianobacterias [1]. Los niveles de concentración de cada isómero dependen del organismo, la especie de planta y la parte de la planta (hojas, raíces, semillas, etc.). Fuentes importantes de tococromanoles son el aceite de palma, el salvado de arroz y el aceite de achiote.

Los tococromanoles son antioxidantes potentes. Se les conoce como potentes antioxidantes que rompen cadenas y secuestran radicales peroxilo, y que también son capaces de desactivar el oxígeno singlete. Cuando se prueba su poder antioxidante en solución o en membranas liposomales, tanto los tocoferoles como los tocotrienoles muestran el mismo poder en sus isómeros correspondientes, pero el poder antioxidante entre los diversos isómeros disminuye según la secuencia  $\alpha > \beta = \gamma > \delta$  [1]. Se sugiere que los tocotrienoles, debido a su cadena de ácidos grasos insaturados, pueden mostrar un mayor poder antioxidante debido a una mayor movilidad dentro de las membranas y entre las mismas, y a una interacción menos restringida con los radicales lipídicos. Además, a diferencia de los tocoferoles, los tocotrienoles no aumentan la rigidez de la membrana [2].

Además del efecto antioxidante, se ha demostrado que la vitamina E también tiene efectos antiinflamatorios [3], antitumorales y antiangiogénicos. Los efectos antiinflamatorios provienen de la capacidad de estas moléculas para bloquear la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , así como la producción de ciclooxigenasa-2 citosólica (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Todos estos factores biológicos inciden en gran medida en la cascada de señalización celular de la respuesta inflamatoria. También se ha descubierto que, de todos los isómeros, el  $\delta$ -tocotrienol era el más eficaz para este propósito y al mismo tiempo poseía la capacidad de bloquear la expresión génica inducida por lipopolisacáridos (LPS) de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e iNOS [4].

En la piel, la vitamina E actúa como antioxidante y antiinflamatorio, protegiendo del daño causado por el estrés oxidativo al secuestrar las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*), tales como los radicales peroxilo y el oxígeno singlete, y al regenerar el glutatión endógeno (GSH) a su forma reducida. En comparación con el  $\alpha$ -tocoferol, los tocotrienoles tienen un mayor poder antioxidante y efectos antiinflamatorios, dado que activan vías antiinflamatorias adicionales. Sin embargo, la administración natural de tocotrienoles presenta importantes inconvenientes, ya que tienen una estabilidad baja en su forma pura y muestran una biodisponibilidad deficiente.

Los tococromanoles, más habitualmente el  $\alpha$ -tocoferol, están presentes en el cuerpo humano, tal como en las membranas celulares y el plasma (en promedio, un agregado de lipoproteína de baja densidad (LDL) contiene entre 5 y 12 moléculas de  $\alpha$ -tocoferol y menos de un tocotrienol u otras moléculas antioxidantes). Los seres humanos no pueden sintetizar moléculas de tococromanol y deben adquirirlas mediante fuentes alimenticias; por lo tanto, se clasifican como nutrientes esenciales [5].

El proceso de absorción de tococromanoles se facilita con la ayuda de la proteína de transferencia de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP); sin embargo, la  $\alpha$ -TTP muestra una mayor afinidad por el isómero alfa del tocoferol, lo que explica, en parte, la baja biodisponibilidad oral de los otros isómeros y formas de la vitamina E [6].

La biodisponibilidad y localización de la vitamina E en el organismo depende en gran medida de la vía de administración. La administración oral es eficiente para el suministro de vitaminas a los sistemas internos del organismo, pero es menos eficiente en el suministro de vitamina E a las capas externas de la piel, en las que es más necesario en el tratamiento de afecciones tópicas. Esto se debe a la naturaleza lipofílica y al tamaño de la molécula. Por lo tanto, a menudo, es preferente la administración tópica para la rápida renovación del contenido de vitamina E en la piel.

5 A excepción del  $\alpha$ -tocoferol, la biodisponibilidad oral de todos los demás isómeros de la vitamina E es sustancialmente menor. Una pequeña cantidad de isómeros de tocotrienoles evitan la  $\alpha$ -TTP por difusión, pero están presentes aún en concentraciones muy bajas en los tejidos. Se ha demostrado que la suplementación con  $\alpha$ -tocoferol disminuye en gran medida la biodisponibilidad y la concentración endógena de otros isómeros de vitamina E (particularmente tocotrienoles) y disminuye sus efectos superiores asociados [7].

10 Cuando se aplica tópicamente, la vitamina E tiene una afinidad elevada por el estrato córneo debido a su naturaleza lipófila y tiene problemas para penetrar más profundamente en la piel. Por lo tanto, la vitamina E administrada tópicamente tendrá un tiempo de residencia elevado en la capa externa de la piel, en la que está expuesta a factores oxidativos y puede degradarse rápidamente, perdiendo de este modo su función. Este es un factor limitante importante para las aplicaciones tópicas y reduce aún más la eficiencia de administración.

15 La elevada tasa de degradación de los tococromanoles se debe a la naturaleza antioxidante de estas moléculas, que hace que reaccionen rápidamente con el oxígeno singlete u otros ROS presentes en la atmósfera. Además, el anillo de cromano, presente en todos los isómeros de la vitamina E, es propenso a la degradación por la radiación UV.

20 Se han desarrollado muchas estrategias para reducir la degradación de la vitamina E en las formulaciones cosmeceúticas. Por ejemplo, la inclusión de coantioxidantes de sacrificio (tales como la vitamina C), sistemas de encapsulación coloidal o modificaciones químicas de las moléculas.

25 La modificación química es la estrategia más utilizada debido a su simplicidad y facilidad para obtener moléculas de vitamina E modificadas que son capaces de sortear los problemas de penetración cutánea y de estabilidad molecular. Estas modificaciones se dirigen habitualmente al grupo hidroxilo del anillo de cromano, el lugar más fácil y biológicamente más apropiado para la modificación. Se han creado una gran cantidad de tocoferoles modificados en O para su aplicación tópica en la piel. Entre los ejemplos se incluyen fosfato de tocoferol, sal de fosfato de tocoferol, ascorbil fosfato de tocoferol, succinato de tocoferol, acetato de tocoferol, cloroacetato de tocoferol, propionato de tocoferol, sales de aminoácidos de tocoferol y salicilato de tocoferol [8]. Los más utilizados en las formulaciones actuales para el tratamiento de afecciones de la piel son el acetato de  $\alpha$ -tocoferol y el succinato de  $\alpha$ -tocoferol.

35 El enlace éster entre el  $\alpha$ -tocoferol y el compuesto modificador unido es de particular importancia. Cuando se modifica en el grupo hidroxilo, la vitamina E pierde sus propiedades antioxidantes [1], pero gana resistencia a la degradación química. El poder antioxidante de la vitamina E se consigue mediante la transferencia de radicales de ROS al grupo hidroxilo, formando radicales tocoferilo y/o tocotrienilo que son más fácilmente eliminados por procesos metabólicos endógenos.

40 El enlace éster en el grupo hidroxilo es de particular interés debido a la presencia de enzimas, tales como las esterasas no específicas, en la piel que hidrolizan el tocoferol o tocotrienol esterificado, produciendo el tocoferol o tocotrienol puro original y el compuesto modificador puro original. Los productos hidrolizados mantienen su actividad química y biológica normal. La actividad de estas esterasas no específicas no es uniforme en toda la piel; se ha informado de una mayor actividad en varias zonas, tales como entre el estrato córneo y el estrato granuloso, la vaina externa de los folículos pilosos activos, las células sebáceas jóvenes y el sebo viejo acumulado [9, 10]. Este último es de especial interés debido a la acumulación de sebo en casos de acné. La modificación del éster es excepcionalmente estable en formulaciones neutras, pero tenderá a degradarse si el pH es demasiado ácido o básico debido a la naturaleza inherente de los ésteres. La modificación química de las moléculas de tococromanol puede mejorar su penetración al modificar la polaridad de las moléculas, lo que les permite penetrar más fácilmente en el estrato córneo.

50 Cuando las moléculas de tocoferol y tocotrienol modificadas mediante un enlace éster son escindidas por las esterasas, el compuesto modificador también se libera en la piel, lo cual es un factor importante a tener en cuenta debido a posibles efectos secundarios, antagonismo, sinergia o citotoxicidad. Las modificaciones más comunes en el mercado liberan compuestos, tales como el acetato y el succinato, que se utilizan en el metabolismo normal, con el fin de disminuir al máximo los efectos secundarios. Sin embargo, utilizar una molécula modificadora que carece de efectos terapéuticos es una oportunidad desaprovechada de aumentar aún más la eficacia de la formulación en el tratamiento tópico, basándose en efectos multifacéticos o sinérgicos.

65 La vitamina B3, tanto en su forma de amida (Niacinamida) como de ácido carboxílico (Ácido nicotínico), es un precursor de coenzimas esenciales para numerosos procesos metabólicos, tales como el metabolismo energético celular, la regulación de la síntesis de ADN y los procesos de transcripción. Los niveles inferiores a lo normal de esta vitamina pueden provocar pelagra, una afección caracterizada por dermatitis fotosensible,

diarrea y demencia [11, 12]. Sin embargo, hoy en día es una afección rara para alguien con una dieta promedio, ya que el pescado, la carne y el trigo son fuentes ricas en esta vitamina.

La vitamina B3 también posee efectos neuroprotectores y antioxidantes que reducen la producción de sebo, las arrugas, la inmunosupresión inducida por los rayos ultravioleta y la pigmentación de la piel [12].

Los cosmeceúticos con niacinamida o compuestos relacionados son eficaces para el tratamiento de afecciones de la piel. Sin embargo, la niacinamida y sus compuestos relacionados pueden provocar efectos secundarios, tales como enrojecimiento en el área aplicada e inflamación sistémica debido a su capacidad elevada de penetración que le permite ingresar al torrente sanguíneo [13].

Estos hechos se dan a conocer con el fin de ilustrar el problema técnico abordado por la presente invención.

### Descripción general

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se refiere a la utilización de tocotrienoles estabilizados en la industria médica, veterinaria o cosmética. En particular, a la utilización de tocotrienoles estabilizados en la prevención, terapia o tratamiento de enfermedades o trastornos de la piel, tales como el acné, la dermatitis seborreica, la rosácea o como agente antienvjecimiento.

La presente invención describe la modificación de tocotrienoles con ácido nicotínico, la modificación de tocotrienoles con un enlazador y ácido nicotínico o alcohol nicotínico, la mayor estabilidad de los tocotrienoles modificados en formulaciones cosméticas, la penetración de tocotrienoles modificados en la piel humana y la conversión de los tocotrienoles modificados en el tocotrienol original y ácido nicotínico, permitiendo de este modo una administración tópica efectiva y simultánea de tocotrienoles y ácido nicotínico.

Los tocotrienoles y tocoferoles forman parte del grupo de moléculas conocidas de manera colectiva como vitamina E y también se denominan "tocolos". El ácido nicotínico se refiere a la vitamina B3, precursora de la niacinamida, que participa en la síntesis de otras moléculas metabólicas importantes.

En una realización, la combinación de  $\alpha$ -tocoferol con ácido nicotínico se consigue mediante un enlace éster producido a partir de la reacción entre el grupo hidroxilo del  $\alpha$ -tocoferol y el grupo carboxilo del ácido nicotínico.

La molécula obtenida se denomina en lo sucesivo nicotinato de  $\alpha$ -tocoferilo.

En una realización, la combinación de los diferentes tocotrienoles con ácido nicotínico se consigue mediante un enlace éster producido a partir de la reacción entre el grupo hidroxilo de los tocotrienoles y el grupo carboxilo del ácido nicotínico. Las moléculas obtenidas a partir de la combinación de ácido nicotínico con  $\alpha$ -tocotrienol,  $\gamma$ -tocotrienol y  $\delta$ -tocotrienol se denominan en lo sucesivo nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienilo, nicotinato de  $\gamma$ -tocotrienilo y nicotinato de  $\delta$ -tocotrienilo, respectivamente. De manera colectiva, se les denomina tocotrienoles modificados.

En una realización, la combinación de  $\alpha$ -tocotrienol con ácido nicotínico o alcohol nicotínico y otra molécula intermedia, denominada en lo sucesivo "enlazador" o "enlazadores", se consigue mediante enlaces éster o amida entre los grupos hidroxilo, amina y carboxilo de las diversas moléculas involucradas en la reacción. Los enlazadores utilizados en este trabajo son ácido glicólico, ácido ferúlico, glicina y ácido succínico. Los enlazadores mencionados anteriormente son ejemplos utilizados con fines ilustrativos; se pueden utilizar otros enlazadores en la reacción. Las moléculas obtenidas a partir de la combinación de ácido nicotínico y enlazadores de ácido glicólico, ácido ferúlico y glicina con  $\alpha$ -tocotrienol se denominan en lo sucesivo nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicolilo, nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil ferulilo y nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicinilo, respectivamente. La molécula obtenida a partir de la combinación del alcohol nicotínico y el enlazador de ácido succínico con  $\alpha$ -tocotrienol se denomina en lo sucesivo succinato de  $\alpha$ -tocotrienil nicotinilo. De manera colectiva, se les denomina  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con enlazadores.

En una realización, la modificación de los otros isómeros de tocotrienol ( $\gamma$ ,  $\delta$ ) con un enlazador y ácido nicotínico o alcohol nicotínico se puede obtener mediante las mismas rutas sintéticas, seleccionando cualquiera de los isómeros, para obtener el respectivo tocotrienol modificado con enlazador.

En una realización, la esterificación de tocotrienoles y ácido nicotínico se consigue mediante reacciones de acoplamiento de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)/4-dimetilaminopiridina (DMAP). El tipo de reacción y las condiciones de reacción seleccionadas se describen en el presente documento como un ejemplo de obtención de moléculas de tocotrienol modificadas. Las moléculas de tocotrienol modificadas se sintetizaron con éxito y la estructura y pureza se confirmaron mediante diversos procedimientos analíticos.

En una realización, la esterificación de tocotrienoles y ácido nicotínico se consigue mediante reacciones de

acoplamiento de haluro de acilo, utilizando específicamente cloruro de nicotinoilo. El tipo de reacción y las condiciones de reacción seleccionadas se describen en el presente documento como un ejemplo para obtener las moléculas de tocotrienol modificadas. Las moléculas de tocotrienol modificadas se sintetizaron con éxito y la estructura y pureza se confirmaron mediante diversos procedimientos analíticos.

5

En una realización, la esterificación/amidación de  $\alpha$ -tocotrienol, enlazador y ácido nicotínico/alcohol nicotinílico se consigue mediante diferentes rutas sintéticas específicas para cada compuesto.

10

En una realización, la síntesis de nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicolilo y nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil ferulilo comprende la esterificación de ácido glicólico o ácido ferúlico y ácido nicotínico mediante una reacción de acoplamiento de haluro de acilo, utilizando específicamente cloruro de nicotinoilo, seguida de una esterificación de la molécula intermedia resultante con  $\alpha$ -tocotrienol mediante reacciones de acoplamiento de EDC/DMAP.

15

En una realización, la síntesis de nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicinilo comprende la esterificación de  $\alpha$ -tocotrienol y BOC-glicina-OH mediante una reacción de acoplamiento de EDC/DMAP, seguida de una desprotección de la molécula intermedia obtenida mediante una hidrólisis selectiva del grupo BOC utilizando ácido trifluoroacético, seguida de una amidación del intermedio obtenido y el ácido nicotínico mediante una reacción de acoplamiento de EDC/DMAP.

20

En una realización, la síntesis de succinato de  $\alpha$ -tocotrienil nicotinilo comprende la esterificación del ácido nicotínico y el ácido succínico mediante una reacción de acoplamiento de anhídrido catalizada por ácido, utilizando específicamente ácido sulfúrico y anhídrido succínico, seguida de la esterificación de la molécula intermedia resultante con  $\alpha$ -tocotrienol mediante una reacción de acoplamiento de EDC/DMAP.

25

En una realización, el tipo de reacción y las condiciones de reacción seleccionadas sirven como ejemplos para obtener los  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con moléculas enlazadoras.

30

En una realización, la estructura y pureza de los tocotrienoles modificados y los  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con enlazadores obtenidos se confirmaron mediante procedimientos analíticos de rutina.

35

En una realización, se evaluaron la penetración en la piel humana y la conversión de los tocotrienoles modificados y los  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con moléculas enlazadoras en la piel humana mediante experimentos de permeación utilizando celdas de difusión de Franz. El perfil de conversión se evaluó y cuantificó midiendo el ácido nicotínico o el alcohol nicotinílico en las soluciones de permeado.

En una realización, se compararon la penetración y permeación cutánea de tocotrienoles modificados y  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con moléculas enlazadoras con nicotinato de  $\alpha$ -tocoferilo.

40

En una realización, se evaluó la penetración de tocotrienoles modificados y nicotinato de  $\alpha$ -tocoferilo cuantificando la cantidad de moléculas no modificadas presentes dentro de la piel después de períodos de tiempo definidos.

45

Los resultados experimentales han confirmado que las moléculas de tocotrienol modificadas, los  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con enlazadores y también el nicotinato de  $\alpha$ -tocoferol, penetran en la piel y se convierten nuevamente en las moléculas iniciales de tocotrienol (o tocoferol), ácido nicotínico y alcohol nicotinílico. También se ha descubierto que la tasa de liberación de ácido nicotínico difiere para diferentes moléculas de tocotrienol modificadas. La liberación de ácido nicotínico a partir del nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienilo fue tres veces más rápida que a partir del nicotinato de  $\gamma$ -tocotrienilo o del nicotinato de  $\delta$ -tocotrienilo. La liberación de ácido nicotínico a partir del nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienilo también fue más rápida que a partir del nicotinato de  $\alpha$ -tocoferilo.

50

En una realización, se evaluó la estabilidad química del nicotinato de  $\alpha$ -tocoferilo, los tocotrienoles modificados, algunos  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con enlazadores, los tocotrienoles no modificados y el  $\alpha$ -tocoferol en una formulación cosmética en pruebas de envejecimiento acelerado (45 °C).

55

60

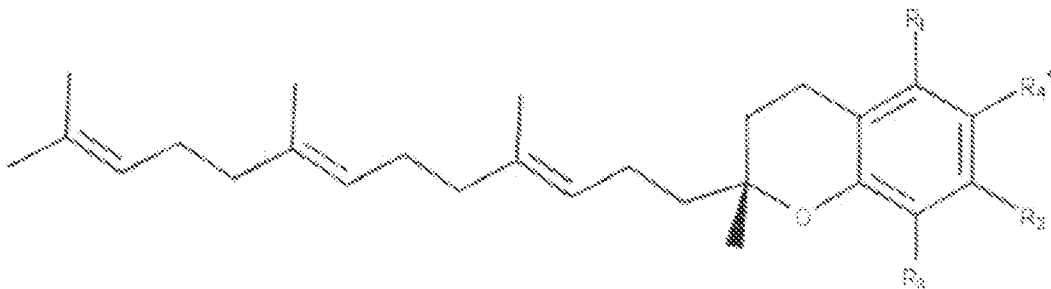
En una realización, se evaluó y comparó la estabilidad química de las moléculas de tocotrienoles modificados, los  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con enlazadores, nicotinato de  $\alpha$ -tocoferilo y de las moléculas de  $\alpha$ -tocoferol,  $\alpha$ -tocotrienol,  $\gamma$ -tocotrienol y  $\delta$ -tocotrienol. Las moléculas modificadas y no modificadas se mezclaron individualmente en una formulación cosmética y se sometieron a un envejecimiento acelerado. Los resultados han demostrado que, después de 3 meses en estas condiciones, la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol,  $\alpha$ -tocotrienol,  $\gamma$ -tocotrienol y  $\delta$ -tocotrienol no modificados disminuyó en un 50 % o más, mientras que las moléculas modificadas permanecen en > 95 % de la masa inicial. En el caso de los  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con enlazadores, los resultados han demostrado que el nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil ferulilo no es

estable y se degrada incluso a temperaturas de almacenamiento en frío, mientras que el nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicolilo, el nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicinilo y el succinato de  $\alpha$ -tocotrienil nicotinilo permanecen en > 95 % de la masa inicial. Por lo tanto, con la excepción del nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil ferulilo, las moléculas modificadas demostraron ser muy estables en la formulación cosmética probada y, lo que es más importante, presentan una mayor estabilidad que los tocoles no modificados.

En una realización, se demostró que las moléculas modificadas penetran la piel humana y se convierten en las moléculas originales. El nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienilo, preferentemente, nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicolilo, se convierte a una tasa mayor que los otros tocotrienoles modificados.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o cosmética que comprende, como mínimo, un compuesto de la fórmula (I) de la presente invención en combinación con, como mínimo, un excipiente aceptable farmacéuticamente o cosméticamente.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula general siguiente (I)



(Fórmula I)

en la que

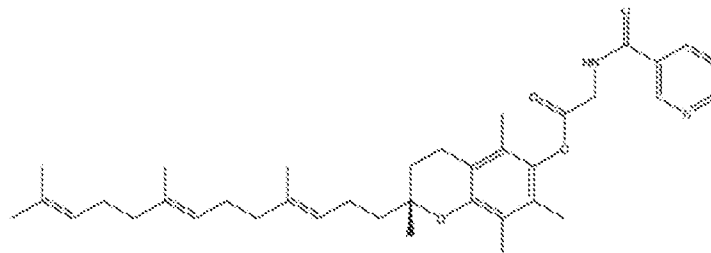
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente entre sí;
- R<sub>1</sub> es H o CH<sub>3</sub>;
- R<sub>2</sub> es H o CH<sub>3</sub>;
- R<sub>3</sub> es H o CH<sub>3</sub>;
- R<sub>4</sub> se selecciona entre una lista que consiste en



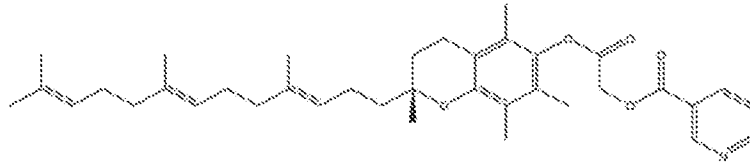
en la que \* representa el sitio de unión, y

R<sub>5</sub> es un residuo de diéster glicólico, un residuo de diéster succínico o un residuo de éster de amida de glicina.

En una realización, el compuesto puede seleccionarse entre las siguientes moléculas:

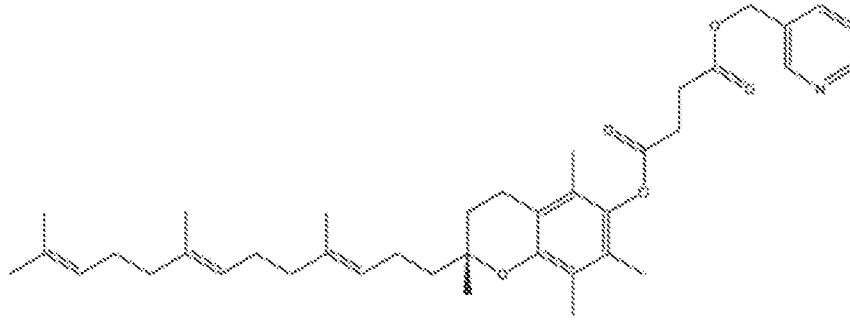


nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicinilo;



nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicolilo;

5



succinato de  $\alpha$ -tocotrienil nicotinilo.

10 En una realización, el compuesto de la presente invención se puede utilizar en medicina, veterinaria o como cosmético. A saber, para su utilización en la prevención, terapia o tratamiento de enfermedades de la piel, trastornos de la piel o antienvjecimiento. Preferentemente, para la prevención, terapia o tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel. Más preferentemente, para su utilización en la prevención, terapia o tratamiento del acné o dermatitis seborreica.

15 En una realización, la composición farmacéutica o cosmética de la presente invención puede comprender hasta un 20 % en masa de, como mínimo, un compuesto de la fórmula (I), en comparación con la masa total de la composición.

20 En una realización, la composición puede comprender del 0,01 % al 10 % en masa de, como mínimo, un compuesto de la fórmula (I), en comparación con la masa total de la composición, más preferentemente, del 0,1 % al 5 % en masa de, como mínimo, un compuesto de la fórmula (I), en comparación con la masa total de la composición, aún más preferentemente, del 0,1 % al 2 % en masa de, como mínimo, un compuesto de la fórmula (I) en comparación con la masa total de la composición.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la prevención, terapia o tratamiento del acné, rosácea o dermatitis seborreica, que comprende la aplicación sobre la piel de un compuesto, composición cosmética/farmacéutica y/o parche con el objeto de la presente invención.

30 En una realización, la composición puede ser una composición tópica. Preferentemente, la composición tópica es un gel, una crema, una loción, una pomada, un suero, una pasta, una espuma, entre otros.

También se da a conocer un procedimiento para el tratamiento cosmético del acné o la dermatitis seborreica que comprende la aplicación sobre la piel de una composición cosmética/farmacéutica.

35 **Descripción breve de los dibujos**

Las siguientes figuras proporcionan realizaciones preferentes para ilustrar la descripción.

40 **Figura 1:** representación esquemática del tocotrienol modificado, incorporación en una formulación cosmética, penetración en la piel humana y conversión a las moléculas originales.

**Figura 2:** cromatogramas de nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienilo, nicotinato de  $\gamma$ -tocotrienilo y nicotinato de  $\delta$ -tocotrienilo después del proceso de síntesis y purificación.

45 **Figura 3:** imagen de una celda de difusión de Franz utilizada en experimentos de permeación. 1- compartimento donante; 2- muestra de piel; 3- compartimento receptor; 4- acceso para toma de muestras; 5- baño de agua termostático.

**Figura 4:** A - Evolución de la concentración de ácido nicotínico en la solución permeada con el tiempo de permeación para nicotinato de  $\alpha$ -tocoferilo; nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienilo y nicotinato de  $\gamma$ -tocotrienilo al 5 % m/m; B - Comparación conjunta de la concentración de ácido nicotínico en la solución de permeación final, después de 48 horas para nicotinato de  $\alpha$ -tocoferilo ( $\alpha$ -T-N), nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienilo ( $\alpha$ -T3-N), nicotinato

de  $\gamma$ -tocotrienilo ( $\gamma$ -T3-N), nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil ferulilo (N-Fer-T3), nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicinilo (N-Gly-T3), nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicolilo (N-Glc-T3) y succinato de  $\alpha$ -tocotrienil nicotínico (N-Suc-T3) al 10 % m/m.

## 5 Descripción detallada

La presente invención también se describe con más detalle, en particular, utilizando realizaciones de la presente invención.

10 La presente invención se refiere a una realización para la utilización de tocotrienoles en medicina, veterinaria o cosmética, a saber mediante la estabilización de tocotrienoles, en particular en formulaciones cosméticas, sin obstaculizar sus funciones en la piel. En particular, la presente invención se refiere a la modificación de tocotrienoles con ácido nicotínico, la estabilización de la molécula y el perfil de penetración en la piel humana.

15 Los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles en medicina, en la industria veterinaria o cosmética, a saber en la prevención, terapia o tratamiento de enfermedades de la piel, trastornos de la piel, o como terapia o tratamiento del acné, dermatitis seborreica o como agente antienvjecimiento.

20 En una realización, el  $\alpha$ -tocoferol, el  $\alpha$ -tocotrienol, el  $\gamma$ -tocotrienol o el  $\delta$ -tocotrienol se hicieron reaccionar con ácido nicotínico siguiendo el procedimiento descrito en el procedimiento general. (Figura 1)

25 En una realización, se realizó la modificación de tocotrienoles y tocoferoles mediante acoplamiento de EDC/DMAP. La evolución de las reacciones se controló mediante cromatografía de capa fina (TLC, *thin layer chromatography*) y los productos se recuperaron después de la extracción líquido-líquido, seguida de purificación mediante cromatografía en columna. La estructura de las nuevas moléculas y su pureza se confirmaron mediante resonancia magnética nuclear de protones (RMN de H), espectroscopia de masas (EM), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

30 En una realización, la modificación de tocotrienoles y tocoferol con ácido nicotínico se consiguió con un procedimiento de reacción basado en el agente de acoplamiento EDC y catalizado por DMAP.

35 En una realización, se añaden EDC (1 equivalente molar) y DMAP (0,05 equivalentes molar) a diclorometano (DCM) y se agitan a temperatura ambiente hasta su disolución completa (habitualmente, son suficientes 20 minutos, aproximadamente). A continuación, esta solución se enfría hasta  $\approx 0$  °C con la ayuda de un baño de agua helada y se añade la masa de ácido nicotínico (1 equivalente molar) hasta que se observa una disolución completa. A continuación, se añade a la mezcla de reacción la masa de tocotrienol o tocoferol, previamente disuelta en DCM para facilitar su manipulación, seguida de la adición inmediata de N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (1 equivalente molar). A continuación, la mezcla de reacción se mantiene con agitación durante toda la noche. La formación exitosa del producto o de los productos deseados se controla mediante análisis de TLC.

45 En una realización, los productos de reacción obtenidos se purificaron. Después del tiempo de reacción definido, la mezcla de reacción se extrae mediante extracción líquido-líquido con agua para eliminar parte de los reactivos no reaccionados y los productos secundarios no deseados que son solubles en agua. La evolución de las extracciones se controla mediante TLC.

50 En una realización, la fracción orgánica, a continuación, se seca del agua residual con sulfato de sodio anhidro y se evapora para eliminar el disolvente. El residuo sólido se recupera y se purifica adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida en columna de fase normal. Las fracciones recogidas se analizan mediante TLC y se combinan en consecuencia. A continuación, el disolvente se elimina al vacío en un evaporador rotatorio, seguido de un secado durante toda la noche en una cámara de alto vacío.

55 En una realización, la síntesis de nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienilo se realizó utilizando ácido nicotínico, EDC, DIEA y DMAP. Las cantidades de ácido nicotínico, EDC, DIEA y DMAP utilizadas están en exceso en relación con el  $\alpha$ -tocotrienol. En un procedimiento, se hicieron reaccionar 1.745 mg de  $\alpha$ -tocotrienol y 1.251 mg de ácido nicotínico utilizando 4.164 mg de EDC, 1.745  $\mu$ l de DIEA y 85 mg de DMAP en 30 ml de DCM. La purificación del nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienol se realizó mediante cromatografía en columna con gel de sílice 60 y elución con DCM/metanol 40:1.

60 En una realización, la síntesis de nicotinato de  $\gamma$ -tocotrienilo se realizó utilizando ácido nicotínico, EDC, DIEA y DMAP. Las cantidades de ácido nicotínico, EDC, DIEA y DMAP utilizadas están en exceso en relación con el  $\gamma$ -tocotrienol. En un procedimiento, se hicieron reaccionar 1.326 mg de  $\gamma$ -tocotrienol y 985 mg de ácido nicotínico utilizando 2.160 mg de EDC, 1.380  $\mu$ l de DIEA y 85 mg de DMAP en 30 ml de DCM. La purificación del nicotinato de  $\gamma$ -tocotrienol se realizó mediante cromatografía en columna, con gel de sílice 60 y elución

con DCM/metanol 40:1.

5 En una realización, la síntesis de nicotinato de  $\delta$ -tocotrienilo se realizó utilizando ácido nicotínico, EDC, DIEA y DMAP. Las cantidades de ácido nicotínico, EDC, DIEA y DMAP utilizadas están en exceso en relación con el  $\delta$ -tocotrienol. En un procedimiento se hicieron reaccionar 584 mg de  $\delta$ -tocotrienol y 566 mg de ácido nicotínico utilizando 1.607 mg de EDC, 778  $\mu$ l de DIEA y 53,2 mg de DMAP en 30 ml de DCM. La purificación del nicotinato de  $\delta$ -tocotrienol se realizó mediante cromatografía en columna con gel de sílice 60 y elución con DCM/metanol 30:1.

10 En una realización, la síntesis de  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con enlazadores se realizó utilizando una gran variedad de rutas sintéticas diferentes según las necesidades prácticas y consideraciones de cada molécula específica.

15 En una realización, se controló la evolución de las reacciones mediante TLC.

En una realización, la estructura y pureza de las nuevas moléculas se confirmó mediante RMN de H, EM, FTIR y HPLC.

20 En una realización, la síntesis de nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicolilo se realizó en un procedimiento de dos etapas. La primera etapa es la esterificación del ácido glicólico y del ácido nicotínico, de la siguiente manera: a un matraz de fondo redondo se añadieron 500 mg de clorhidrato de cloruro de nicotinoilo, 640 mg (3 equivalentes) de ácido glicólico y 20 ml de acetonitrilo, bajo agitación en un baño de hielo etanólico; la mezcla se agitó hasta alcanzar la temperatura de -10 °C y, a continuación, se añadió 1 ml de DIEA y la mezcla se dejó reaccionar durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de reacción asignado, se añadieron al medio de  
25 reacción 2,5 ml de cloruro de palmitoilo, seguido inmediatamente de la adición de 2 ml de DIEA. La mezcla se dejó reaccionar durante 30 minutos adicionales. A continuación, se añadieron al medio de reacción 10 ml de agua desionizada y se agitó el medio durante toda la noche; a continuación, se filtró el medio de reacción y se recuperó el filtrado. Se eliminó al vacío el acetonitrilo del filtrado en un evaporador rotatorio a 45 °C, aproximadamente, y, a continuación, se liofilizó para eliminar el agua restante. En la segunda etapa, el  
30 producto en bruto obtenido en la primera etapa se utilizó sin purificación adicional. En un matraz de fondo redondo se mezclaron bajo agitación 400 mg de producto en bruto, 540 mg (6 equivalentes) de EDC, 5 mg de DMAP y 20 ml de DCM. Se añadieron a la mezcla 200 mg de  $\alpha$ -tocotrienol disueltos en 0,5 ml de DCM, seguido de 0,5 ml de DIEA. La reacción se dejó en agitación durante 1 hora a una temperatura que variaba de 18 °C a 25 °C. El medio de reacción se extrajo sucesivamente con 30 ml de ácido cítrico al 5 % y tres  
35 porciones de 50 ml de agua desionizada. Las fracciones orgánicas se recuperaron, se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron. El disolvente se eliminó al vacío en un evaporador rotatorio a 45 °C, aproximadamente. La estructura y la pureza de las nuevas moléculas se confirmaron mediante RMN de H, EM, FTIR y HPLC.

40 En una realización, la síntesis de nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil ferulilo se realizó en un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se disolvieron 720 mg (1,5 eq) de ácido ferúlico en 20 ml de acetonitrilo en un matraz de fondo redondo y se enfrió hasta -10 °C utilizando un baño de hielo etanólico. Se añadieron 980 mg de clorhidrato de cloruro de nicotinoilo al recipiente de reacción y la mezcla se agitó durante 5 minutos, seguida de la adición gota a gota de 2 ml de DIEA bajo agitación vigorosa durante 1 minuto. La reacción se  
45 agitó durante 2 horas adicionales para asegurar que la reacción se completara. A continuación, el medio de reacción se extrajo sucesivamente con tres porciones de 50 ml de agua desionizada; las fracciones orgánicas se recuperaron, se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio. A continuación, se eliminó el disolvente al vacío en un evaporador rotatorio a, aproximadamente, 30 °C. El producto en bruto obtenido se volvió a disolver en una cantidad mínima de ácido fórmico al 5 % en acetonitrilo y se purificó mediante HPLC preparativa en un sistema de fase inversa (columna preparativa Waters Atlantis C18, 19 x 250 mm, 10  $\mu$ m,  
50 acetonitrilo:agua 60:40 a 20 ml/min). Para la segunda etapa, se añadieron 50 mg del intermedio obtenido de la primera etapa a un matraz de fondo redondo, junto con 96 mg de EDC (3 equivalentes) y 5 mg de DMAP en 10 ml de DCM y se agitó completamente durante 10 minutos. Se añadieron al recipiente de reacción 70 mg de  $\alpha$ -tocotrienol disueltos en 5 ml de DCM para facilitar su manipulación, seguido inmediatamente de la  
55 adición de 0,2 ml de DIEA, bajo agitación vigorosa. La reacción se agitó durante 2 horas para asegurar que se completara. A continuación, el medio de reacción se extrajo sucesivamente con 30 ml de solución de ácido cítrico al 5 % (p/v) y tres porciones de 50 ml de agua desionizada. Las fracciones orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio. El disolvente se eliminó al vacío en un evaporador rotatorio a 30 °C, aproximadamente. El producto en bruto obtenido se volvió a disolver en una cantidad mínima de ácido fórmico al 5 % en acetonitrilo y se purificó mediante HPLC preparativa en un sistema de fase inversa (columna preparativa Waters Atlantis C18, 19 x 250 mm, 10  $\mu$ m, 100 % acetonitrilo a 20 ml/min).

65 En una realización, la síntesis de nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicinilo se realizó en un procedimiento de tres etapas. En la primera etapa se añadieron a un matraz de fondo redondo 120 mg de BOC-Glicina-OH (1,5 equivalentes), 410 mg de EDC (4,5 equivalentes), 20 mg de DMAP y 15 ml de DCM bajo agitación vigorosa.

Se disolvieron 120 mg de  $\alpha$ -tocotrienol en 5 ml de DCM, para facilitar su manipulación, y se añadieron al recipiente de reacción, seguidos inmediatamente de 3 ml de DIEA, bajo agitación vigorosa. La reacción se agitó durante 2 horas adicionales para asegurar que se completara. El medio de reacción se extrajo sucesivamente con 30 ml de ácido cítrico al 5 % en agua y dos porciones de 50 ml de agua desionizada. Las fracciones orgánicas se recuperaron, se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio. El disolvente se eliminó al vacío en un evaporador rotatorio a 40 °C, aproximadamente. El producto en bruto se utilizó en las siguientes etapas sin purificación adicional. En la segunda etapa, se añadió al producto en bruto bajo agitación una solución que comprendía 3 ml de DCM + 3 ml de ácido trifluoroacético (TFA) y se dejó reaccionar durante 1 hora para asegurar la eliminación del grupo protector BOC. El medio de reacción se evaporó azeotrópicamente con metanol al vacío en un evaporador rotatorio a 40 °C, aproximadamente. El producto en bruto se volvió a disolver en DCM y se extrajo con tres porciones de 50 ml de agua desionizada. Las fracciones orgánicas se recuperaron, se combinaron, se secaron con sulfato de sodio y se filtraron. En la tercera etapa la fracción orgánica filtrada de la segunda etapa se colocó en un matraz de fondo redondo bajo agitación vigorosa y se le añadió una solución fresca previamente preparada de 120 mg de ácido nicotínico (2 equivalentes), 1,2 g de EDC (6 equivalentes) y 5 mg de DMAP en 5 ml de DCM y se agitó durante 10 minutos adicionales. Se añadió 1 ml de DIEA al medio de reacción y la reacción se agitó durante 1 hora adicional a temperatura ambiente para asegurar que se completara. La reacción se extrajo sucesivamente con 30 ml de ácido cítrico al 5 % y tres porciones de 50 ml de agua desionizada. Las fracciones orgánicas se recuperaron, se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio. El disolvente se eliminó al vacío en un evaporador rotatorio a, 40 °C, aproximadamente. El producto en bruto obtenido se volvió a disolver en una cantidad mínima de DCM y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en fase normal. La columna se rellenó con 50 g de gel de sílice 60 dispersos en una solución de DCM:metanol 10:1, se cargó con la cantidad total de producto en bruto obtenido en la tercera etapa y se eluyó con una solución de DCM:metanol 10:1.

En una realización, la síntesis de succinato de  $\alpha$ -tocotrienil nicotínico se realizó en un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se añadieron 770 mg de anhídrido succínico, 1,9 g de alcohol nicotínico (1,9 equivalentes) y 20 ml de acetonitrilo a un matraz de fondo redondo y se agitaron durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ l de ácido sulfúrico al 98 % a la mezcla bajo agitación vigorosa y la reacción se agitó durante 1 hora adicional para asegurar que la reacción se completara, aunque la reacción evoluciona rápidamente formando grumos de precipitados blancos y amarillo pálido. Se filtró el medio de reacción, se recuperó el filtrado y se transfirió a un matraz de fondo redondo bajo agitación. Se añadieron 4 ml de cloruro de palmitoilo y 2,5 ml de DIEA al recipiente de reacción y la mezcla se agitó durante 1 hora adicional. Se filtró nuevamente el medio de reacción y se recuperó el filtrado. A continuación, se extrajo el filtrado con tres porciones de 30 ml de hexano. Se recuperó la fracción de acetonitrilo y se eliminó el disolvente al vacío en un evaporador rotatorio a 40 °C, aproximadamente. El producto en bruto obtenido se disolvió en 50 ml de agua desionizada y se filtró mediante un filtro de vidrio sinterizado (tamaño 4). El filtrado se recuperó, se liofilizó y se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. En la segunda etapa, se mezclaron en un matraz de fondo redondo 296 mg del producto en bruto obtenido en la etapa anterior, 542 mg de EDC (6 equivalentes) y 20 mg de DMAP en 15 ml de DCM. A continuación, se añadieron al medio de reacción 200 mg de  $\alpha$ -tocotrienol disueltos en 5 ml de DCM, seguido inmediatamente de la adición de 4 ml de DIEA, bajo agitación vigorosa. La reacción se agitó durante 2 horas adicionales para asegurar que se completara. A continuación, la reacción se extrajo sucesivamente con una solución de ácido cítrico al 5 % y tres porciones de 50 ml de agua desionizada. Las fracciones orgánicas se recuperaron, se combinaron y se secaron con sulfato de sodio. El disolvente se eliminó al vacío en un evaporador rotatorio a 40 °C, aproximadamente. El producto en bruto obtenido se disolvió en una cantidad mínima de ácido fórmico al 5 % en acetonitrilo y se purificó mediante HPLC preparativa en un sistema de fase inversa (columna preparativa Waters Atlantis C18, 19 x 250 mm, 10  $\mu$ m, 100 % acetonitrilo a 20 ml/min).

En una realización, los análisis de TLC se realizaron en placas de gel de sílice 60 con soporte de aluminio impregnadas con la sonda de fluorescencia F254 (Merck). Las placas tenían 8 cm de longitud y las muestras tenían un recorrido de 7,5 cm. Las placas reveladas se visualizaron bajo luz UV (254 nm y 365 nm) antes de aplicar cualquier solución de revelado (tinción). Las tinciones utilizadas (tinciones TLC, tinción de Seebach, tinción de Draggendorff) sirven para la identificación universal de compuestos y también para la detección selectiva de compuestos.

En una realización, los productos de reacción se caracterizaron adicionalmente mediante FTIR, HPLC, EM y RMN de H. Las mediciones de FTIR se realizaron en un espectrofotómetro IRPrestige-21 de Shimadzu, utilizando la ventana de los gránulos de bromuro de potasio (KBr) comprimidos. Los espectros se obtuvieron en el modo de transmisión, en el intervalo de 4.000  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y como promedio de 32 mediciones individuales. Los análisis de HPLC se realizaron en un cromatógrafo Knauer compuesto por 3 módulos: Smartline manager 5000, Smartline pump 1000 y Smartline UV Detector 2600. El detector UV está equipado con un conjunto de fotodiodos (PDA, *photo diode array*) que permite un control continuo de 190 - 450 nm. El sistema de columnas estaba compuesto por una precolumna (fase inversa C18 Atlantis T3, 5  $\mu$ m, 4,6 x 20 mm) y una columna (fase inversa C18 Atlantis T3, 5  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm), que se mantuvieron a 30 °C utilizando un horno específico. La elución se realizó con acetonitrilo (que contenía ácido

acético al 0,1 % v/v) a 1 ml/min y el volumen de inyección fue de 50  $\mu$ l. Los espectros de EM se adquirieron en un espectrómetro de masas Triple Cuadrupolo Quattro Micro (Waters) mediante infusión directa de soluciones que contenían la muestra. Las temperaturas de desolvatación y el flujo de gas (N<sub>2</sub>) se establecieron en 300 °C y 600 l/h para la sonda y 120 °C y 20 l/h para el capilar. El voltaje capilar fue de 4,00 keV y el voltaje del cono se estableció en 40 V. Los espectros se registraron en el modo espectro iónico de producto ("daughter mode") utilizando argón (Ar) como gas de colisión. Después de la selección y el bloqueo de m/z del ion molecular respectivo y el ajuste de la energía de colisión, los registros se realizaron en el intervalo m/z de 50 a 600. La molécula de interés se disolvió en acetonitrilo:metanol 1:1 y se infundió a 20  $\mu$ l/min.

En una realización, después de la eliminación completa del disolvente, las moléculas modificadas se caracterizaron adicionalmente siguiendo los protocolos descritos. Los resultados de FTIR muestran la presencia de una fuerte banda de absorción a, aproximadamente, 1740  $\text{cm}^{-1}$ , característica del enlace éster y la ausencia de bandas de absorción en la región de 2750-3500  $\text{cm}^{-1}$ , características de los grupos hidroxilo y carboxilo. Los cromatogramas de HPLC (figura 2) para cada producto de reacción purificado presentan solo un pico y los espectros de MS muestran la presencia del pico de ion molecular esperado (según la tabla I). Los picos del espectro de RMN de H concuerdan con las estructuras esperadas. Las moléculas de tocotrienol modificado y  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con enlazadores se obtuvieron con una pureza del 97 % m/m o superior.

Tabla I - Resultado del análisis de EM de los productos de reacción: masa molecular teórica y pico de iones moleculares obtenidos para las moléculas sintetizadas.

Molécula	Masa teórica	Pico molecular, [M+H] <sup>+</sup>
$\alpha$ -tocoferol	430,71	431,24
$\alpha$ -tocotrienol	424,66	425,16
$\gamma$ -tocotrienol	410,63	411,41
$\delta$ -tocotrienol	396,61	397,13
nicotinato de $\alpha$ -tocoferol	535,82	536,24
nicotinato de $\alpha$ -tocotrienilo	529,77	531,25
nicotinato de $\gamma$ -tocotrienilo	515,74	516,40
nicotinato de $\delta$ -tocotrienilo	501,72	502,31
nicotinato de $\alpha$ -tocotrienil glicolilo	587,80	588,11
nicotinato de $\alpha$ -tocotrienil ferulilo	705,94	706,24
nicotinato de $\alpha$ -tocotrienil glicinilo	586,82	587,11
succinato de $\alpha$ -tocotrienil nicotinilo	615,86	616,97

En una realización, se evaluó la permeación cutánea de los compuestos modificados. Las pruebas de permeación se realizaron con piel humana de grosor completo. Estas muestras se obtuvieron en un hospital local, de donantes sanos sometidos a cirugía estética. La piel extirpada se almacenó en una solución de PBS que contenía 10 % de antibiótico y se mantuvo a 4 °C hasta su posterior procesamiento en el laboratorio. Una vez recibida la muestra de piel, se extrajo y descartó el tejido graso subyacente. La piel restante (capas de dermis y epidermis) se cortó en trozos de, aproximadamente, 1,5 x 1,5 cm. Cuando los experimentos de permeación se realizaron con piel fresca, las muestras se utilizaron inmediatamente. De lo contrario, las muestras de piel previamente cortadas se congelaron a -80 °C y se almacenaron para su utilización posterior. Al recuperar las muestras de piel congeladas, las muestras se sacaron del almacenamiento y se descongelaron hasta temperatura ambiente durante 1 hora antes de su posterior manipulación.

Los experimentos de permeación se realizaron en celdas de difusión de Franz. Estas celdas de difusión están constituidas por un compartimento donante, en el que se coloca la formulación que contiene la molécula de permeado, y un compartimento receptor que contiene el fluido receptor en el que se recoge la molécula de permeado y se acumula en el tiempo. La muestra de piel se coloca entre los compartimentos donante y receptor y está equipada además con un acceso de muestreo que permite la recogida de muestras (un cierto volumen del fluido receptor) sin requerir el desmontaje de la celda y, por lo tanto, permite que el experimento de permeación continúe (figura 3).

Al comienzo del experimento, el compartimento receptor se llena con el fluido receptor y la muestra de piel se coloca en su lugar con cuidado para que no se formen burbujas de aire debajo. El receptor donante se coloca

en su lugar y se sujeta. A continuación, el conjunto se coloca en el baño termostático (37 °C) durante 30 minutos para permitir el equilibrio de la temperatura. Después del tiempo de equilibrio, el nivel del fluido receptor se ajusta según sea necesario. El compartimento receptor está equipado con un mezclador magnético, que garantiza la homogeneidad de la solución durante el transcurso del experimento de permeación.

En una realización, las soluciones de permeado se controlan para detectar la presencia de ácido nicotínico liberado a partir de las moléculas de tocoferol y tocotrienoles modificadas. La cantidad de ácido nicotínico se cuantifica mediante HPLC utilizando un procedimiento de apareamiento iónico. La concentración de ácido nicotínico se calcula a partir de una curva de calibración patrón de soluciones de concentración de ácido nicotínico conocida medidas en las mismas condiciones. El análisis HPLC se realiza en un cromatógrafo Knauer que consiste en 3 módulos: Smartline manager 5000, Smartline pump 1000 y Smartline UV Detector 2600. El detector UV está equipado con un conjunto de fotodiodos (PDA) que permite un control continuo de 190 - 450 nm. Los cromatogramas en línea se controlan a 254 nm. El eluyente comprende un eluyente de apareamiento iónico (50 mM de hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH), pH corregido a 7,4 con hidrogenofosfato dibásico (Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)) que contiene 10 % de acetonitrilo a un caudal de 1 ml/min y la columna utilizada es una Atlantis T3 4,6 x 250 mm (con columna de protección del mismo tipo 4,6 x 20 mm) a 30 °C.

En una realización, los experimentos de permeación de la piel se realizan con formulaciones de diferentes concentraciones de moléculas de tocotrienol y tocoferol modificadas. Las moléculas modificadas se disuelven en concentraciones del 5 % y el 10 % m/m en una mezcla de volúmenes iguales de 2-(2-etoxietoxi)etanol y propilenglicol y se aplican 150 µl de estas soluciones sobre las muestras de piel. Se cuantifica la concentración de ácido nicotínico presente en las soluciones permeadas del experimento con una solución donante de concentración de 5 % m/m para diferentes puntos temporales (8, 24, 33 y 48 horas). Para el experimento con una solución donante de concentración del 10 % m/m, se cuantifica la concentración de ácido nicotínico en las soluciones permeadas después de 48 horas de permeación. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla II y en la figura 4.

Tabla II - Concentración (µg/ml) de ácido nicotínico en la solución de permeado.

Concentración	Punto temporal/ Horas	Compuesto permeable		
		α-T-N	α-T3-N	γ-T3-N
5 % m/m	8	ND	ND	ND
	24	ND	0,32	ND
	33	ND	0,54	ND
	48	0,06	0,89	0,09
10 % m/m	48	0,72	2,83	0,70

α-T-N: nicotinato de α-tocoferilo; α-T3-N: nicotinato de α-tocotrienilo; γ-T3-N: nicotinato de γ-tocotrienilo; ND: No detectable.

En una realización, los experimentos de permeación de la piel se realizaron con formulaciones de diferentes concentraciones de α-tocotrienol modificado con moléculas enlazadoras. Las moléculas modificadas se disolvieron en concentraciones del 10 % m/m en una mezcla de volúmenes iguales de 2-(2-etoxietoxi)etanol y propilenglicol y se aplicaron 150 µl de estas soluciones sobre las muestras de piel. Se cuantificó la concentración de ácido nicotínico en las soluciones de permeado de los experimentos con nicotinato de α-tocotrienil ferulilo, nicotinato de α-tocotrienil glicolilo y nicotinato de α-tocotrienil glicinilo mediante HPLC, utilizando el procedimiento de apareamiento iónico descrito. La concentración de alcohol nicotínico en la solución de permeado de succinato de α-tocotrienil nicotinilo se midió mediante HPLC, utilizando la misma configuración del sistema, pero utilizando agua como eluyente. Se determinaron las concentraciones de ácido nicotínico y alcohol nicotínico después de 24 y 48 horas de permeación. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla III.

Tabla III - Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) de ácido nicotínico y alcohol nicotínico en la solución de permeado.

Concentración	Punto temporal/Horas	Compuesto permeable			
		N-Fer-T3	N-Gly-T3	N-Suc-T3	N-Glc-T3
10 % m/m	24	1,19	0,18	NC*	3,02
	48	2,96	0,38		8,18

**N-Fer-T3:** nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil ferulilo; **N-Gly-T3:** nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicinilo; **N-Suc-T3:** succinato de  $\alpha$ -tocotrienil nicotínico; **N-Glc-T3:** nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicolilo; **NC:** No cuantificable. \*Se detectaron trazas de alcohol nicotínico, insuficientes para la cuantificación.

5 En una realización, la cantidad de compuesto de tocotrienol modificado o tocoferol modificado presente dentro de la piel se cuantificó al final del experimento de permeación. Para ello, al finalizar el experimento de permeación con una solución donante de concentración del 10 % m/m, se recogieron las muestras de piel, se retiró la formulación restante presente en el compartimento donante de la celda de difusión de Franz y se lavó completamente con agua destilada. Las muestras de piel se extrajeron con tres volúmenes de 5 ml de acetonitrilo, se combinaron los volúmenes y se cuantificó la presencia de compuestos modificados mediante HPLC, siguiendo las condiciones analíticas descritas para la determinación de la pureza de los compuestos.

10 Se descubrió que la cantidad de compuesto modificado era comparable entre las diferentes moléculas y era, aproximadamente, 0,600 mg/cm<sup>2</sup> de piel.

15 En una realización, el nivel más elevado de ácido nicotínico se encontró en las soluciones de permeado de nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienilo para moléculas sin enlazador, y de nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicolilo para moléculas con un enlazador.

20 En una realización, se evaluó la estabilidad química de las moléculas modificadas en pruebas de degradación acelerada. Para este propósito, las moléculas de prueba se formularon en una formulación cosmética relevante y se evaluaron sus degradaciones durante un período de 3 meses.

En una realización, la formulación cosmética puede comprender agua, aceite de semilla de jojoba, butilenglicol, escualano, hialuronato de sodio, alcohol cetearílico y un carbómero.

25 En una realización, la formulación cosmética puede comprender ingredientes adicionales adecuados para obtener características adicionales deseadas en la formulación cosmética.

30 En una realización, se añadieron las moléculas de prueba a la formulación cosmética a un nivel de 0,1 % m/m, se homogeneizaron completamente para garantizar una dispersión uniforme y se almacenaron en botellas de vidrio cerradas en un horno a 45 °C durante 3 meses. Para evaluar la homogeneidad y la estabilidad, se recogieron 3 muestras de posiciones aleatorias inmediatamente después de la preparación y en cada punto de tiempo evaluado. La cuantificación de las moléculas de prueba se realizó mediante HPLC.

35 En una realización, la preparación de las mezclas para la evaluación de la estabilidad se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo experimental. La masa del compuesto se pesó y se disolvió en 2-(2-etoxietoxi)etanol (también pesado) y se añadió a una masa conocida de producto humectante. La mezcla se homogeneizó y se recogieron 3 muestras para confirmar la distribución homogénea y la concentración inicial de moléculas modificadas. A continuación, las mezclas se almacenaron en un horno a 45 °C durante 3 meses (tabla IV).

40 En una realización, se determinó la estabilidad de las moléculas de prueba en la formulación cosmética. Las mezclas de prueba se muestrearon por triplicado en zonas aleatorias. Las muestras se prepararon para el análisis solubilizándolas en acetonitrilo y la cuantificación de las moléculas de tocoferol y tocotrienol modificadas y no modificadas se realizó mediante HPLC. El % de los compuestos iniciales se describe en la tabla IV. Los tocotrienoles modificados no se degradaron durante el tiempo de almacenamiento mientras que los tocotrienoles no modificados se degradaron hasta, aproximadamente, la mitad o menos de la cantidad inicial. Los  $\alpha$ -tocotrienoles modificados con enlazadores mostraron un comportamiento diferente dependiendo de la molécula. El nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicinilo, el nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil glicolilo y el succinato de  $\alpha$ -tocotrienil nicotínico mostraron una excelente estabilidad, mientras que el nicotinato de  $\alpha$ -tocotrienil ferulilo es inestable incluso en condiciones de almacenamiento en frío.

50

Tabla IV – % de compuesto inicial después de almacenamiento en estufa a 45 °C durante 3 meses.

Compuesto	% del compuesto después de 3 meses
$\alpha$ -tocoferol	44 %

Compuesto	% del compuesto después de 3 meses
$\alpha$ -tocotrienol	53 %
$\gamma$ -tocotrienol	20 %
$\delta$ -tocotrienol	57 %
nicotinato de $\alpha$ -tocoferilo	$\geq 95$ %
nicotinato de $\alpha$ -tocotrienilo	$\geq 95$ %
nicotinato de $\gamma$ -tocotrienilo	$\geq 95$ %
nicotinato de $\delta$ -tocotrienilo	$\geq 95$ %
nicotinato de $\alpha$ -tocotrienil glicinilo	$\geq 95$ %
succinato de $\alpha$ -tocotrienil nicotinilo	$\geq 95$ %
nicotinato de $\alpha$ -tocotrienil glicolilo	$\geq 95$ %
nicotinato de $\alpha$ -tocotrienil ferulilo	0 %

El término "que comprende" siempre que se utiliza en el presente documento pretende indicar la presencia de características, números enteros, etapas o componentes indicados, pero no excluir la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos.

5

Quando se utilizan formas singulares de elementos o características en la especificación de las reivindicaciones, también se incluye la forma plural, y viceversa, si no se excluye específicamente. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "el compuesto" también incluye las formas plurales "compuestos" o "los compuestos", y viceversa. En las reivindicaciones, los artículos tales como "un", "una" y "el" o "la" pueden significar uno o más de uno, a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se utilizan o son de otro modo relevantes para un producto o proceso determinado, a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto. La presente invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se utiliza o es de otro modo relevante para un producto o proceso determinado. La presente invención también incluye realizaciones en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se utilizan o son de otro modo relevantes para un producto o proceso determinado.

20

## Referencias

1. Muller, L., K. Theile, and V. Bohm, In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Mol Nutr Food Res*, 2010. 54(5): págs. 731-42.
2. Yoshida, Y., E. Niki, and N. Noguchi, Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chem Phys Lipids*, 2003. 123(1): págs. 63-75.
3. Guo, M., et al., Inhibitory effects of Schisandra chinensis extract on acne-related inflammation and UVB-induced photoageing. *Pharm Biol*, 2016. 54(12): págs. 2987-94.
4. Shibata, A., et al., Suppression of gamma-tocotrienol on UVB induced inflammation in HaCaT keratinocytes and HR-1 hairless mice via inflammatory mediators multiple signaling. *J Agric Food Chem*, 2010. 58(11): págs. 7013-20.
5. Colombo, M. L., An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. *Molecules*, 2010. 15(4): págs. 2103-13.
6. Manor, D., Morley, S., The  $\alpha$ -Tocopherol Transfer Protein. In *Vitamins & Hormones*, Academic Press: 2007; Vol. 76, págs. 45-65.
7. Gee, P. T., Unleashing the untold and misunderstood observations on vitamin E. *Genes Nutr*, 2011. 6(1): págs. 5-16.
8. Parkhurst, R. M. and W. A. Skinner, Chromanols and Tocopherols, in *Chemistry of Heterocyclic*

45

Compounds (eds G. P. Ellis and I. M. Lockhart). 2008. págs. 59-137.

9. Heymann, E., et al., Organophosphate sensitive and insensitive carboxylesterases in human skin. *Chem Biol Interact*, 1993. 87(1-3): págs. 217-26.

5

10. Montagna, W., Histology and cytochemistry of human skin. IX. The distribution of non-specific esterases. *J Biophys Biochem Cytol*, 1955. 1(1): págs. 13-6.

10

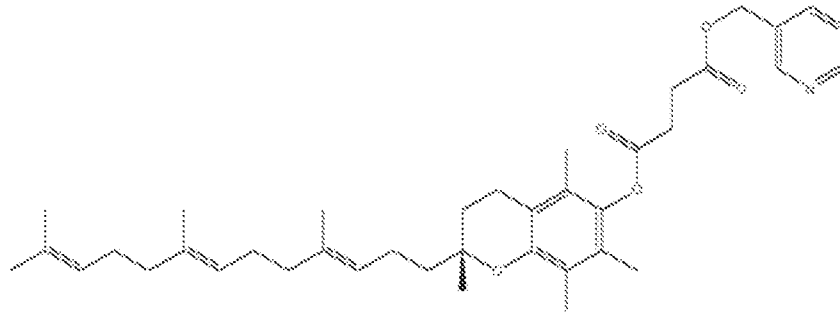
11. Khodaeiani, E., et al., Topical 4 % nicotinamide vs. 1 % clindamycin in moderate inflammatory acne vulgaris. *Int J Dermatol*, 2013. 52(8): págs. 999-1004.

12. Walocko, F. M., et al., The role of nicotinamide in acne treatment. *Dermatol Ther*, 2017; 30: e12481.

15

13. Rolfe, H. M., A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. *J Cosmet Dermatol*, 2014. 13(4): págs. 324-8.





3. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en medicina o veterinaria.
- 5 4. Compuesto para su utilización, según la reivindicación 3, en la prevención, terapia o tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel, enfermedades de la piel o trastornos de la piel.
5. Compuesto para su utilización, según la reivindicación 4, en la prevención, terapia o tratamiento del acné, la rosácea o la dermatitis seborreica.
- 10 6. Utilización no terapéutica del compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en cosmética.
7. Utilización no terapéutica, según la reivindicación 6, en la que el compuesto se utiliza como agente antienvjecimiento.
- 15 8. Composición farmacéutica o cosmética que comprende, como mínimo, un compuesto descrito, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en combinación con, como mínimo, un excipiente aceptable farmacéuticamente o cosméticamente.
- 20 9. Composición farmacéutica o cosmética, según la reivindicación 8, en la que dicha composición comprende hasta un 20 % en masa de, como mínimo, un compuesto descrito, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, basado en la masa total de la composición.
- 25 10. Composición farmacéutica o cosmética, según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en la que dicha composición comprende del 0,01 % al 10 % en masa de, como mínimo, un compuesto descrito, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, basado en la masa total de la composición.
- 30 11. Composición farmacéutica o cosmética, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que dicha composición comprende del 0,1 % al 5 % en masa de, como mínimo, un compuesto descrito, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, basado en la masa total de la composición.
- 35 12. Composición farmacéutica o cosmética, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que dicha composición comprende del 0,1 % al 2 % en masa de, como mínimo, un compuesto descrito, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, basado en la masa total de la composición.
- 40 13. Composición farmacéutica o cosmética, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en la que la composición es una composición tópica.
14. Composición farmacéutica o cosmética, según la reivindicación 13, en la que la composición tópica está en forma de gel, crema, loción, pomada, suero, pasta o espuma.
15. Parche que comprende el compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o la composición descrita según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14.

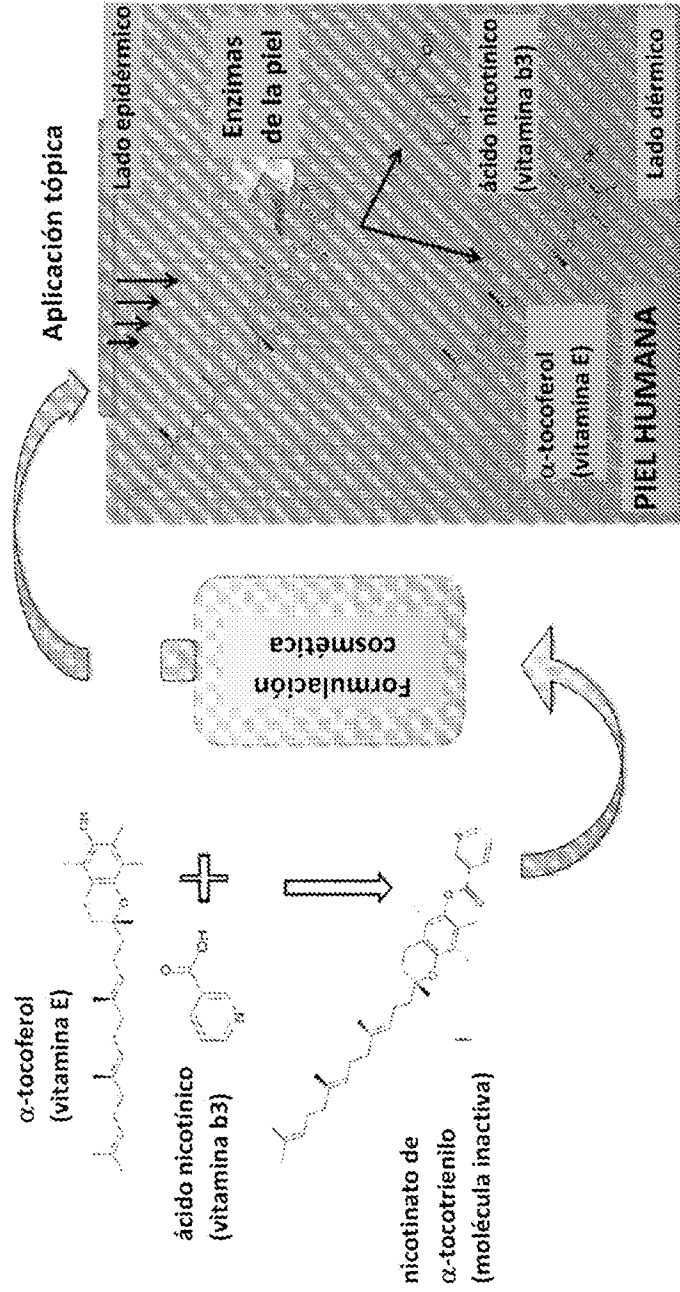


Fig. 1.

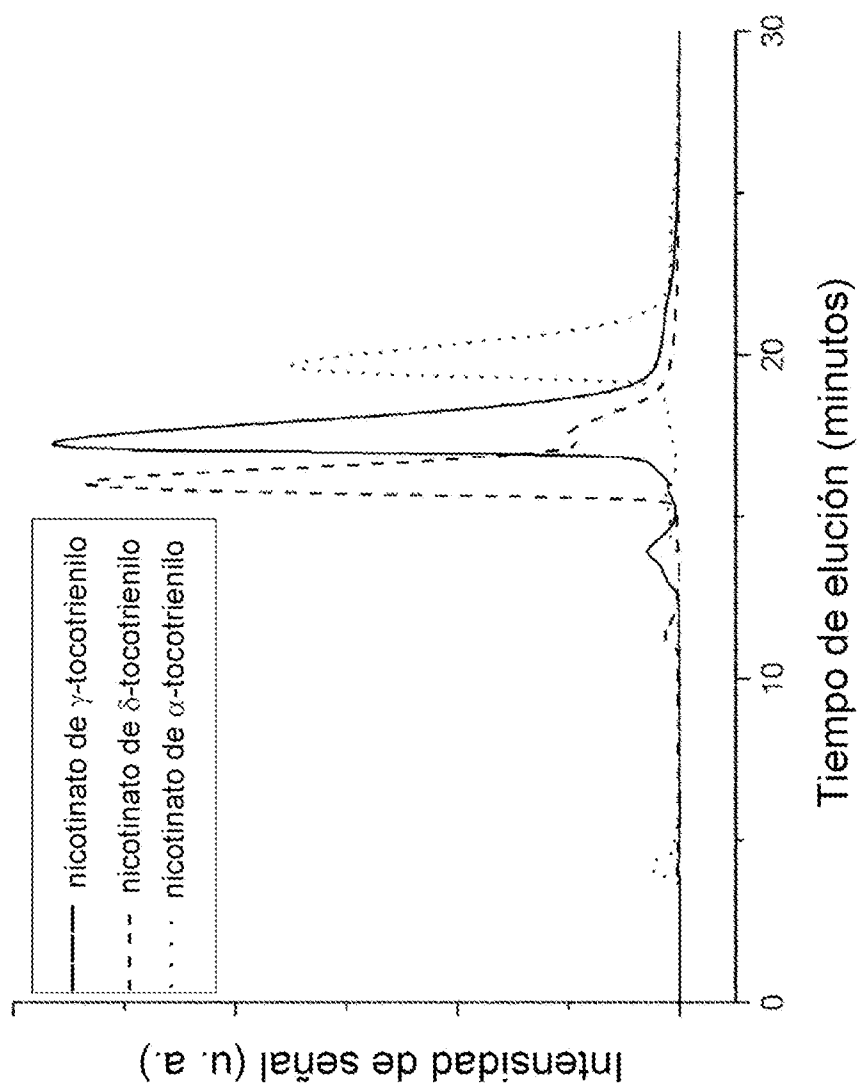


Fig. 2.

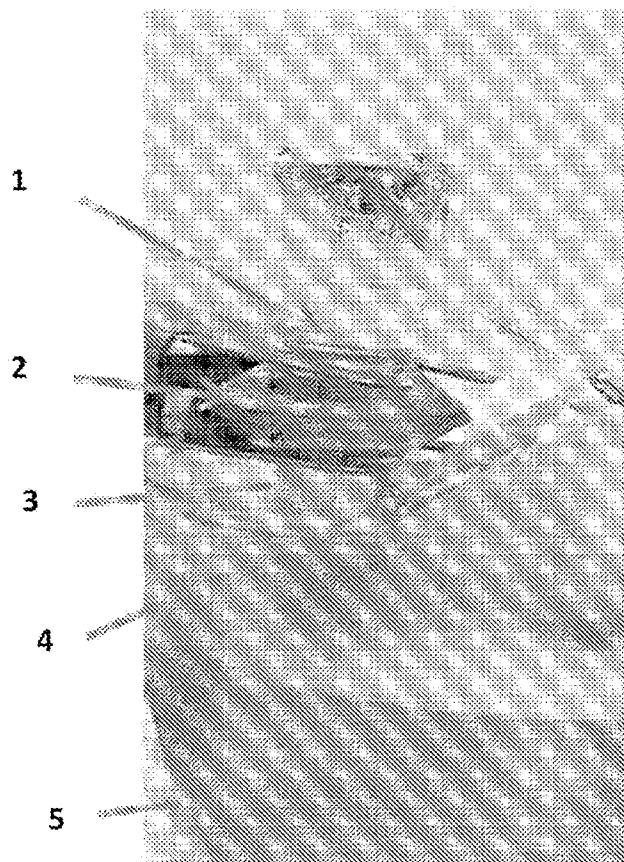


Fig. 3.

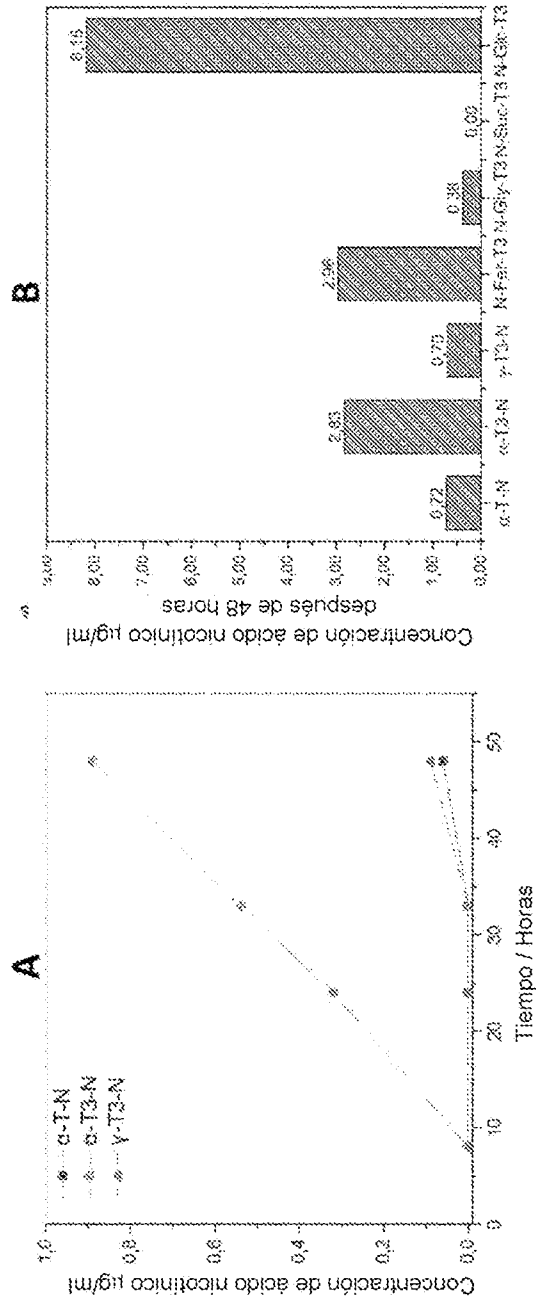


Fig. 4

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

5

## Literatura no patente citada en la descripción

- MULLER, L.; K. THEILE ; V. BOHM. In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Mol Nutr Food Res*, 2010, vol. 54 (5), 731-42
- YOSHIDA, Y. ; E. NIKI ; N. NOGUCHI. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chem Phys Lipids*. 2003, vol. 123 (1), 63-75
- GUO, M. et al. Inhibitory effects of Schisandra chinensis extract on acne-related inflammation and UVB-induced photoageing. *Pharm Biol*, 2016, vol. 54 (12), 2987-94
- SHIBATA, A. et al. Suppression of gamma-tocotrienol on UVB induced inflammation in HaCaT keratinocytes and HR-1 hairless mice via inflammatory mediators multiple signaling. *J Agric Food Chem*. 2010, vol. 58 (11), 7013-20
- COLOMBO, M.L. An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. *Molecules*, 2010, vol. 15 (4), 2103-13
- The  $\alpha$ -Tocopherol Transfer Protein. MANOR, D. ; MORLEY, S. In *Vitamins & Hormones*. Academic Press, 2007, vol. 76, 45-65
- GEE, P.T. Unleashing the untold and misunderstood observations on vitamin E. *Genes Nutr*, 2011, vol. 6 (1), 5-16
- PARKHURST, R.M. ; W.A. SKINNER. Chromanols and Tocopherols, in *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2008, 59-137
- HEYMANN, E et al. Organophosphate sensitive and insensitive carboxylesterases in human skin. *Chem Biol Interact*, 1993, vol. 87 (1-3), 217-26
- MONTAGNA, W. Histology and cytochemistry of human skin IX. The distribution of non-specific esterases. *J Biophys Biochem Cytol*, 1955, vol. 1 (1), 13-6
- KHODAEIANI, E. et al. Topical 4% nicotinamide vs. 1% clindamycin in moderate inflammatory acne vulgaris. *Int J Dermatol*. 2013, vol. 52 (8), 999-1004
- WALOCKO, F.M. et al. The role of nicotinamide in acne treatment. *Dermatol Ther*, 2017, vol. 30, e12481
- ROLFE, H.M. A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. *J Cosmet Dermatol*, 2014, vol. 13 (4), 324-8

10