

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 913**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08	(2006.01)
A61K 8/29	(2006.01)
A61K 8/73	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01)
A61K 8/02	(2006.01)
A61K 8/11	(2006.01)
A61K 8/19	(2006.01)
B82Y 5/00	(2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.01.2009 PCT/ES2009/000001**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2017 WO09087254**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2009 E 09700387 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2228393**

54 Título: **Conjugado de ácido hialurónico para tratamiento cosmético y procedimiento de preparación**

30 Prioridad:

04.01.2008 ES 200800011

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

15.02.2018

73 Titular/es:

**ENDOR NANOTECHNOLOGIES, S.L. (100.0%)
EDIFICIO HELIX C/ BALDIRI REIXAC 15
08028 BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:

**RAMIS CASTELLTORT, MARC;
OJEA JIMENEZ,, ISAAC y
QUEROL SASTRE,, JOAQUIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 654 913 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

Conjugado de ácido hialurónico para tratamiento cosmético y procedimiento de preparación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un nuevo compuesto conjugado de ácido hialurónico y una nanopartícula metálica, así como a un procedimiento para su obtención. Asimismo, la invención se refiere a su uso en tratamientos cosméticos.

Antecedentes de la invención

10 El ácido hialurónico o HA, es un glicosaminoglicano natural muy abundante en todos los tejidos mesodérmicos, en el humor vítreo y en la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Está presente en la matriz intercelular de los tejidos, en los diferentes tejidos de todas las especies animales y desempeña una importante función en la estructura de la piel, siendo responsable de la elasticidad de la misma. Tiene la capacidad de retener a su alrededor una gran cantidad de agua aportando volumen a los tejidos.

15 Su estructura consiste en unidades de disacárido alternantes de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces glicosídicos β -1-3 y β -1-4. A diferencia de otros polisacáridos, el HA no tiene una forma definida en el espacio, sino que se extiende aleatoriamente tendiendo a ocupar un volumen muy grande debido a la repulsión electrostática de los grupos carboxilo del ácido glucurónico. Al mismo tiempo, forma mallas que retienen una gran cantidad de agua.

20 El HA tiene un papel decisivo como elemento conjuntivo de los tejidos. La piel contiene cerca del 56% del HA presente en el cuerpo. La dermis corporal posee una red entramada de fibras de colágeno dentro de una sustancia intersticial ampliamente compuesta por HA. Las propiedades elásticas de este ácido proporcionan resistencia contra la compresión, y es así como la piel protege las estructuras subyacentes contra las agresiones externas, a la vez que las propiedades no-newtonianas del HA permiten que las fibras de colágeno se muevan fácilmente a través de la sustancia intersticial. Este proceso de lubricación mediante HA permite que la piel se adapte a las alteraciones de forma y volumen que tienen lugar cuando se mueven los huesos y los ligamentos.

25 Cuando envejecemos, disminuye la cantidad de HA de la piel, dado que las células cutáneas van perdiendo progresivamente su capacidad de producción. Además, el peso molecular del HA disminuye con la edad, de tal modo que ya no conserva el agua, como lo hacía anteriormente. Esta reducción de volumen es la que da origen a las arrugas. Se estima que a la edad de 40 años la cantidad de HA en piel se ha reducido a la mitad. Después de los 60 solo queda un 10%.

30 El HA se ha estado utilizando en cosmética desde 1996; puede ser de origen animal (de las crestas de las gallinas y de los globos oculares de los peces) o de origen biológico (extractos de cultivo de bacterias). El HA es el responsable de la elasticidad de la piel. Es un gran remedio contra las arrugas, pues aumenta el volumen en pliegues, surcos y depresiones cutáneas. Su aplicación periódica provoca la regeneración del propio colágeno de la piel. La ventaja de este producto es que es una sustancia compatible con todos los tejidos; por lo tanto no requiere de ningún tipo de prueba cutánea como ocurre con el colágeno.

35 Se conocen bien tratamientos cosméticos en el estado de la técnica a base de HA. Sin embargo, la aplicación cosmética de HA, conlleva la pérdida de la conformación del HA, y como consecuencia una disminución de la estabilidad y de la capacidad de retener agua.

Por tanto sigue existiendo la necesidad en el estado de la técnica de proporcionar nuevos compuestos de HA que mejoren el tiempo de vida y la estabilidad del HA para que se puedan utilizar en tratamientos cosméticos.

40 En este sentido los inventores han descubierto sorprendentemente que la conjugación de oligómeros de HA a la superficie de una nanopartícula metálica a través de un enlazador, mejora las propiedades de estructura física, estabilidad y durabilidad, y en general las propiedades de penetración transdérmica. La aplicación cosmética de este conjugado proporciona por tanto un efecto sobre la piel relleno de arrugas, eficaz y duradero, que puede sustituir a otros tratamientos menos eficaces.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa un modelo ilustrativo de un compuesto conjugado de la invención, que comprende una nanopartícula metálica y 2 oligómeros (de 6-mer) de tiopropionilhidrazida-HA, en el que cada uno de los oligómeros está derivatizado a través de un enlace químico amida, y en la que cada enlazador une cada oligómero de HA a la nanopartícula metálica.

50 La Figura 2 representa un modelo ilustrativo de un compuesto conjugado que contiene una nanopartícula metálica y 2 oligómeros de HA (de 4-mer), en la que cada uno de los oligómeros está derivatizado en las posiciones ácido carboxílico con dos enlazadores, los cuales unen cada oligómero de HA a la nanopartícula metálica.

La Figura 3 representa un modelo ilustrativo de un compuesto conjugado que consiste en 1 oligómero de 8-mer de HA derivatizado en las posiciones ácido carboxílico a través de enlaces químicos amida con 4 enlazadores, los cuales unen el oligómero a 1 nanopartícula metálica.

5 La Figura 4 representa un modelo ilustrativo de un compuesto conjugado que consiste en 1 oligómero de 8-mer conjugado con 4 nanopartículas metálicas.

La Figura 5 muestra un esquema de un compuesto conjugado que consiste en un oligómero de HA con n monómeros unidos cada uno mediante un enlazador a una nanopartícula metálica.

La Figura 6, imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) capturadas con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7000 con un voltaje de aceleración de 75 Kv del compuesto conjugado obtenido en el Ejemplo 1.

10 La Figura 7, espectros de absorción de UV-Vis de una disolución de nanopartículas de oro y del compuesto conjugado obtenido en el Ejemplo 1, registrados con un espectroscopio Shimadzu UV-240IPC. A representa la absorbancia y λ la longitud de onda (nm).

La Figura 8 representa el potencial-Z registrado mediante un Zetasizer Nano ZS, Malvern del compuesto conjugado obtenido en el Ejemplo 1, donde I representa la intensidad y zeta representa el potencial en mV.

15 La Figura 9, esquema de un oligómero HA 2-mer de n monómeros derivatizado a través de un enlace amida con tiopropionilhidrazida.

La Figura 10, imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) capturadas con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7000 con un voltaje de aceleración de 75 Kv del compuesto conjugado obtenido en el Ejemplo 3.

20 La Figura 11, espectros de absorción de UV-Vis de una disolución de nanopartículas de oro y de un compuesto conjugado según la invención (Ejemplo 3) registrados con un espectroscopio Shimadzu UV-240IPC. A representa la absorbancia y λ la longitud de onda (nm).

La Figura 12 representa el potencial-Z registrado mediante un Zetasizer Nano ZS, Malvern del compuesto conjugado obtenido en el Ejemplo 3, donde I representa la intensidad, y zeta representa el potencial en mV.

25 **Objeto de la invención**

Un objeto de la presente invención se refiere a un nuevo compuesto conjugado que comprende:

- una nanopartícula metálica; y
- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica, con la condición de que cuando el oligómero de HA presenta un número de monómeros n, y $n > 1000$, y la nanopartícula es una nanopartícula de oro con un tamaño de 20 nm, el enlazador es distinto de $H_2N-CH_2-CH_2-SH$.

Otro objeto de la presente invención se refiere a diversos procedimientos de síntesis para la obtención del nuevo compuesto conjugado.

35 Un objeto adicional se refiere a un compuesto conjugado que se puede obtener mediante uno de los procedimientos de síntesis de la presente invención.

Otro objeto adicional se relaciona con un compuesto multiconjugado que comprende:

- una nanopartícula metálica; y
- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica, y
- al menos, una molécula que se conjuga a, al menos, una nanopartícula metálica.

Otro objeto adicional se refiere a una composición cosmética, en adelante composición cosmética de la invención, que comprende al menos un compuesto seleccionado entre:

45 Un compuesto conjugado que comprende:

- una nanopartícula metálica; y

- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica, y un compuesto multiconjugado de la invención, junto con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

5 Otro objeto adicional se refiere al empleo de al menos un compuesto seleccionado entre un compuesto conjugado que comprende:

- una nanopartícula metálica; y
- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica, y un compuesto multiconjugado de la invención, en la preparación de una composición cosmética diseñada para su aplicación tópica o para su aplicación mediante inyección en la piel.

10

Un objeto adicional se refiere a un tratamiento cosmético que comprende la aplicación tópica o inyectada de la composición cosmética de la presente invención.

Descripción de la invención

15 De acuerdo con un primer aspecto, la invención se relaciona, por tanto, con un nuevo compuesto conjugado que comprende:

- una nanopartícula metálica; y
- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica, con la condición de que cuando el oligómero de HA presenta un número de monómeros n , y $n > 1000$, y la nanopartícula es una nanopartícula de oro con un tamaño de 20 nm, el enlazador es distinto de $H_2N-CH_2-CH_2-SH$.

20

En el contexto de la invención el término "enlazador" se refiere a una molécula orgánica que se une de forma covalente a un oligómero de HA, como se explica más adelante, y une dicho oligómero de HA con la nanopartícula metálica. El enlazador en la presente invención contiene al menos un átomo de azufre que se une a la nanopartícula metálica. El enlazador puede tener en general numerosas estructuras químicas diferentes, siempre que el enlazador cumpla su función de unir el oligómero de HA y la nanopartícula metálica. Dichas estructuras pueden ser variables y fácilmente reconocidas por un experto en la materia. En una realización particular de la invención el enlazador presenta una de las fórmulas generales que divulgadas más abajo.

25

30 El término "monómero" de HA en la presente descripción se refiere a una unidad formada por dos residuos consecutivos de ácido *D*-glucurónico y *N*-acetil-*D*-glucosamina unidos.

El término "mer" de HA en la presente descripción se refiere a una unidad de sacárido, que puede ser indistintamente tanto de ácido *D*-glucurónico como de *N*-acetil-*D*-glucosamina.

35

El término "polímero de HA" se utiliza en la presente invención para referirse a un oligómero de HA natural, que se obtiene de una fuente biológica natural, como por ejemplo las citadas en los Antecedentes de la invención, y puede adquirirse de diversas empresas que lo comercializan. En casos es evidente que "polímero de HA" y "oligómero de HA" se refieren al mismo compuesto, cuando tienen el mismo número de monómeros y la misma estructura; así como en ocasiones son iguales sus correspondientes derivados, "polímero de HA derivatizado" y "oligómero de HA derivatizado". El empleo del término "polímero de HA" se hace en la presente descripción por motivos de claridad, para referirse al producto de partida de HA natural que se utiliza en la invención para obtener los compuestos conjugados o multiconjugados de la invención, en algunos de los procedimientos de la invención, y que no ha sido sometido a hidrólisis enzimática como se describe más adelante.

40

En la presente descripción términos en singular tales como "un", "uno", "una", "el", "la" o "del" se pueden referir en cada caso a la forma singular o plural.

45

El compuesto conjugado puede presentar muy diversas estructuras, propiedades, y pueden variar los diversos parámetros que lo caracterizan. Entre otros parámetros cabe mencionar los siguientes: el tamaño de la nanopartícula metálica, que puede ser a su vez, bien una nanopartícula o bien una partícula núcleo-coraza y que puede comprender un metal como se describe más abajo; el número de nanopartículas metálicas en el compuesto conjugado que está generalmente comprendido entre 1 y un número máximo que puede ser determinado en cada caso mediante técnicas de caracterización física, y que depende, entre otros factores del número total de enlazadores del oligómero de HA; el peso molecular del oligómero de HA y por tanto del número de monómeros de HA; el tipo de enlazador, es decir su fórmula química, y el número de enlazadores que unen el oligómero de HA a la nanopartícula metálica; y dependiendo del enlazador el tipo de enlace químico que une covalentemente el oligómero de HA al enlazador que puede ser un

50

enlace amida, éster y éter. Asimismo, un compuesto conjugado puede comprender más de un oligómero conjugado, con distintos números de monómeros cada uno.

Como se desprende de la presente descripción son muy numerosos los compuestos conjugados definidos en la presente invención.

5 De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto conjugado presenta una estructura que comprende:

a) una nanopartícula metálica y uno o más oligómeros de HA, en el que cada uno de los oligómeros de HA está derivatizado con un enlazador a través de un enlace químico, y en la que cada enlazador une cada oligómero de HA a la nanopartícula metálica, (ver un ejemplo concreto de este tipo de estructura en la Figura 1)

10 En otra realización particular de la invención el compuesto conjugado presenta una estructura que comprende:

b) una nanopartícula metálica y uno o más oligómeros de HA, en la que cada uno de los oligómeros está derivatizado con al menos dos enlazadores los cuales unen cada oligómero de HA a la nanopartícula metálica, (ver un ejemplo concreto de este tipo de estructura en la Fig.2)

En otra realización particular de la invención el compuesto conjugado presenta una estructura que comprende:

15 c) uno o más oligómeros de HA derivatizados con más de un enlazador cada uno, los cuales unen cada oligómero de HA a una o más nanopartículas metálicas (ver un ejemplo concreto de este tipo de estructura en la Fig. 3 y otro Ejemplo en la Figura 4).

20 La Figura 5 muestra el esquema de un compuesto conjugado con una estructura de acuerdo con la realización particular anterior c), descrito anteriormente, en el que un oligómero de HA presenta n monómeros cada uno unido mediante un enlazador a una nanopartícula metálica. Dado que el tamaño de la nanopartícula metálica es mucho mayor que la separación entre las posiciones por las que el oligómero de HA se derivatiza, es posible que una misma nanopartícula metálica se conjugue al oligómero a través de más de una posición (Figura 3).

25 La nanopartícula metálica del compuesto conjugado puede seleccionarse de entre el grupo formado por nanopartículas y partículas núcleo-coraza. La nanopartícula, el núcleo y la coraza pueden estar independientemente compuestos por un material seleccionado del grupo formado por los metales Au, Ag, Pt, Co, Fe, los óxidos derivados de uno cualquiera de los metales anteriores y TiO₂. En una realización preferente la nanopartícula es una nanopartícula de oro. Tanto las nanopartículas de oro como las partículas núcleo-coraza de oro presentan una superficie muy versátil para funcionalizarla con diversos tipos de biomoléculas como el HA. Se trata de un elemento noble y muy poco reactivo en medios biológicos.

30 La nanopartícula metálica presenta un tamaño medio de diámetro variable generalmente comprendido entre 2 y 100 nm. En una realización preferida el tamaño medio de diámetro está comprendido entre 4 - 50nm. En otra realización más preferida el tamaño medio de diámetro está comprendido entre 6-30nm, y en una realización aún más preferida el tamaño medio de diámetro está comprendido entre 8-15 nm.

35 El oligómero de HA o el oligómero de HA derivatizado comprende en general entre 1 y un número máximo de monómeros, determinado por la naturaleza biológica del propio ácido hialurónico. Generalmente, este número máximo está en torno a 50,000 monómeros de HA. En una realización particular el oligómero de ácido hialurónico comprende entre 1-1000 monómeros de HA; en otra realización particular comprende entre 1-100 monómeros de HA, y en otra realización particular comprende entre 2-25 monómeros de HA. Finalmente en una realización preferida el HA derivatizado comprende 3 monómeros.

40 En el compuesto conjugado el oligómero de HA se derivatiza con, al menos, un enlazador y a través de, al menos, un enlace químico covalente que se selecciona de entre un enlace amida, éster y éter en función del grupo funcional del HA que se hace reaccionar en la reacción de derivatización y de la fórmula del enlazador que se utiliza. En este sentido, en una realización particular de la invención, el enlace es amida -CONH-, formado entre un grupo ácido libre de un mer (ácido glucurónico) de HA y un enlazador de fórmula general H₂N-R₁-S-R₂ en la que:

45 R₂ representa un grupo seleccionado entre H, -CH₃, -(CH₂)_n-CH₃, -(CH₂)_n-CH=CH₂ y -S-R₁-NH₂ y R₁ representa un grupo seleccionado de entre -(CH)_n-, -(CH)(COOH)(CH₂)_n-, -NH-CO-(CH₂)_n-, donde n representa un número entero comprendido entre 1 y 20.

50 En una realización preferida, en el enlazador de fórmula general H₂N-R₁-S-R₂, R₂ representa un grupo seleccionado de entre H, -CH₃, -CH₂-CH₃ y -CH₂-CH=CH₂ y R₁ representa un grupo seleccionado de entre -(CH)(COOH)(CH₂)_n-, donde n es 1 o 2.

En una realización más preferida el enlazador es tiopropionilhidrazida y presenta la fórmula $\text{NH}_2\text{-NH-CO-(CH}_2)_n\text{-SH}$, donde n es 2. En particular, el oligómero de HA ya derivatizado con este enlazador, se puede obtener de forma comercial (Glycosil™, Glycosan Biosystems Inc.) para su posterior empleo en la obtención de un compuesto conjugado según algunos de los procedimientos de la presente invención que se divulgan más abajo.

5 De acuerdo con otra realización particular el oligómero de HA está derivatizado según una de las siguientes alternativas:

- a) a través de, al menos, un enlace químico éster -COO- , formado entre un grupo ácido carboxílico de un mer (ácido glucurónico) de HA y un enlazador de fórmula general $\text{HO-R}_1\text{-S-R}_2$, o
- b) a través de, al menos, un enlace químico éter -O- formado entre un grupo -OH del oligómero de HA y un enlazador de fórmula general $\text{GS-R}_1\text{-S-R}_2$,

10 donde

R_2 representa un grupo seleccionado entre
 H , -CH_3 , $\text{-(CH}_2)_n\text{-CH}_3$, $\text{-(CH}_2)_n\text{-CH=CH}_2$ y $\text{-S-R}_1\text{-NH}_2$ y
 R_1 representa un grupo seleccionado de entre
 $\text{-(CH)}_n\text{-}$, $\text{-(CH)(COOH)(CH}_2)_n\text{-}$, donde n representa un número entero comprendido entre 1 y 20; y
 GS representa un grupo saliente.

15

En una realización preferente, en las fórmulas generales $\text{HO-R}_1\text{-S-R}_2$ y $\text{GS-R}_1\text{-S-R}_2$,

R_2 representa un grupo seleccionado de entre H , -CH_3 , $\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ y $\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ y

R_1 representa un grupo $\text{-(CH}_2)_n\text{-}$ donde n es un valor comprendido entre 1 y 20.

20 El compuesto conjugado presenta una relación número de mers de HA/ número de nanopartículas metálicas comprendida generalmente entre 2 y 100000. En una realización particular entre 4 y 2000; de acuerdo con otra realización particular entre 4 y 200; y según otra realización particular entre 4 y 50.

El número de nanopartículas metálicas en el compuesto conjugado está generalmente comprendido entre 1 y un número máximo que puede ser determinado mediante técnicas de caracterización físicas, y que depende de diversos factores tales como el número total de enlazadores del oligómero de HA.

25 En una realización particular el compuesto conjugado se obtiene de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El compuesto conjugado ha sido visualizado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) (Figura 6). Las nanopartículas de oro muestran propiedades ópticas debido al plasmón de resonancia de la superficie, de este modo es posible medir con precisión la adsorción de moléculas general a la superficie del metal.

30 La imagen de TEM muestra que las nanopartículas de oro se concentran en grupos separados y dispersos. La Figura 7 muestra el Espectro UV-Vis de las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato sódico, y cómo la conjugación de los oligómeros de HA derivatizado a ellas induce a un desplazamiento del pico de absorción a una longitud de onda mayor, en este caso a 522 nm con respecto al de las nanopartículas de oro sin conjugar (519 nm). La Figura 8 muestra el potencial Z donde se observa que la conjugación de los oligómeros de HA derivatizado induce a un desplazamiento del pico de potencial Z a -19,1 mV en comparación con el pico de -50,8 mV correspondiente a las nanopartículas de oro no conjugadas.

35

Como se mencionó anteriormente de acuerdo con una realización particular el compuesto conjugado es el que presenta una estructura general como la que se representa en la Figura 5. En un caso más particular el compuesto conjugado comprende nanopartículas de oro de 8 nm aproximadamente, y un oligómero de HA derivatizado, cuya fórmula se muestra en la Figura 9, "tiopropionilhidrazida-HA". Este compuesto conjugado se obtiene de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 y ha sido caracterizado.

40

En este sentido el compuesto conjugado ha sido visualizado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). En la Figura 10-A se observa que las nanopartículas de oro sin conjugar al HA tienden a ordenarse por sí mismas en agrupaciones características, donde la distancia entre nanopartículas es la mínima posible debido a su estabilización con citrato sódico.

45 Por otra parte, en el caso de que las nanopartículas de oro se conjuguen al HA (Figura 10-B), se observa que están más distanciadas y se pierde su agrupación característica inicial de las nanopartículas sin conjugar. En este caso, se intuye que las nanopartículas de oro se agrupan a lo largo de las cadenas de oligómeros de HA, que, a la vez, se entrecruzan (efecto cross-linking) formando una maya del compuesto conjugado.

50 En esta realización particular, las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato sódico muestran un pico a 521,2 nm (aprox.). En cambio cuando se conjugan a oligómeros de HA derivatizados se puede observar que se produce un desplazamiento del pico de absorción a una longitud de onda mayor en este caso a 523,8 nm (Figura 11).

El compuesto conjugado presenta gran estabilidad y resistencia a ser absorbido por el organismo debido a su conjugación con las nanopartículas metálicas. Como consecuencia el HA mantiene su gran capacidad de retener agua. Además parece, aunque los inventores no desean verse ligados a ninguna teoría, que la nanopartícula metálica podría actuar como inhibidor de la actividad de la enzima hialuronidasa sobre el HA, lo cual podría tener también un efecto adicional sobre la durabilidad de las propiedades del HA.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se relaciona con procedimientos de preparación de un compuesto conjugado que comprende:

- una nanopartícula metálica; y
- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica, con la condición de que cuando el oligómero de HA presenta un número de monómeros n , y $n > 1000$, y la nanopartícula es una nanopartícula de oro con un tamaño de 20 nm, el enlazador es distinto de $H_2N-CH_2-CH_2-SH$.

La preparación de los compuestos conjugados puede hacerse de acuerdo con uno o más de los siguientes procedimientos que se describen a continuación, todos ellos objetos de la presente invención.

Los procedimientos que se describen a continuación comprenden una etapa común, la preparación de una nanopartícula metálica que se lleva a cabo con control de forma y tamaño mediante reacciones químicas bien conocidas para los expertos en la materia. En una realización particular se preparan nanopartículas de oro, y el método para ello se basa en métodos sintéticos ampliamente descritos en la literatura como el denominado del citrato de sodio, (Turkevich, J., P. C. Stevenson, et al. (1951). "[The nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold.]" Discussions of the Faraday Society 11: 55-75) o también por reducción con $NaBH_4$ (Haiss, W., N. T. Thanh, et al. (2007). "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra." Anal Chem 79(11): 4215-21).

Los distintos procedimientos se describen a continuación:

El Procedimiento A) comprende las siguientes etapas:

- (i) hidrólisis enzimática de un polímero de HA;
- (ii) obtención de los fragmentos oligómeros de HA;
- (iii) derivatización de los fragmentos oligómeros de HA por reacción química con un enlazador que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter; y
- (iv) conjugación de al menos un fragmento oligómero de HA derivatizado obtenido en la etapa anterior a una nanopartícula metálica.

El Procedimiento B) comprende las siguientes etapas:

- (i) derivatización de un polímero de HA por reacción química con un enlazador que comprende un grupo -S- por formación de al menos un enlace químico amida, éster o éter;
- (ii) hidrólisis enzimática del polímero de HA derivatizado;
- (iii) obtención de fragmentos oligómeros de HA derivatizados; y
- (iv) conjugación de al menos uno de los fragmentos obtenidos en la etapa anterior con una nanopartícula metálica.

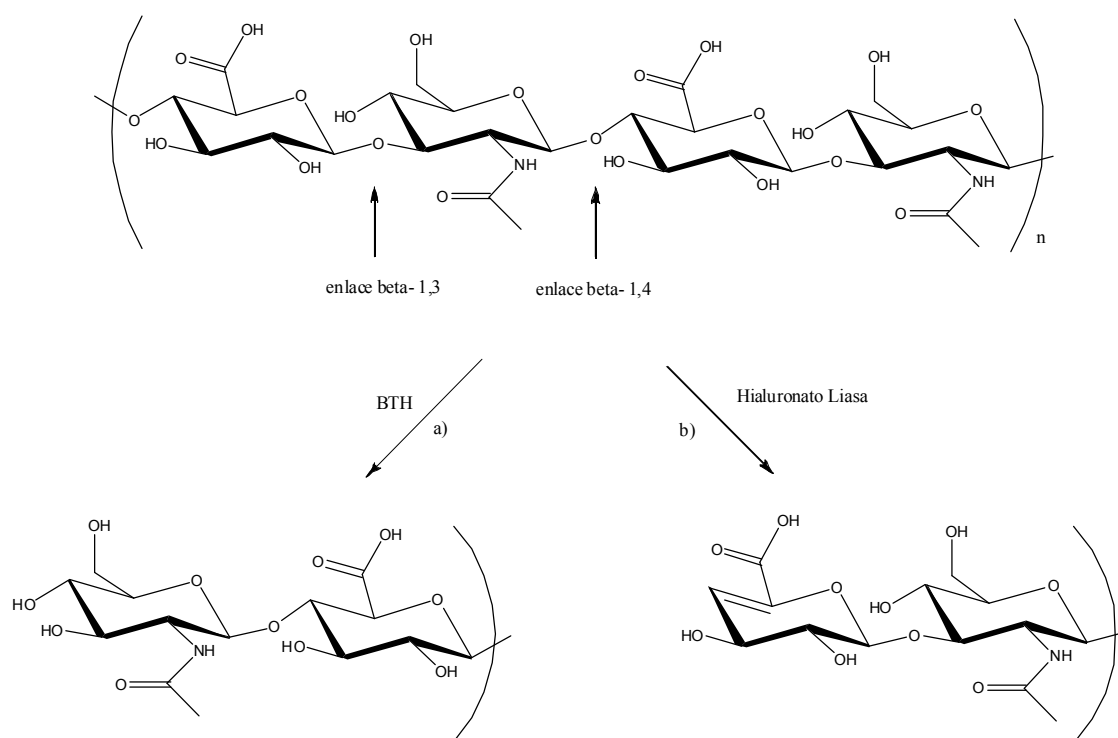
El Procedimiento C) comprende las siguientes etapas:

- (i) derivatización de un polímero de HA por reacción química con un enlazador que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter; y
- (ii) conjugación del polímero de HA derivatizado obtenido en la etapa anterior a una nanopartícula metálica;
- (iii) hidrólisis enzimática del polímero de HA derivatizado;
- (iv) obtención del compuesto conjugado.

De acuerdo con el Procedimiento A, la etapa (ii) consiste en la hidrólisis enzimática de un polímero de HA. El polímero de HA de partida, se obtiene de forma comercial como se ha mencionado anteriormente. El polímero de HA comprende a su vez oligómeros de diferente número de mers de HA, los cuales se hidrolizan para dar fragmentos oligosacáridos (fragmentos oligómeros) de menor tamaño y estructura variable mediante la acción

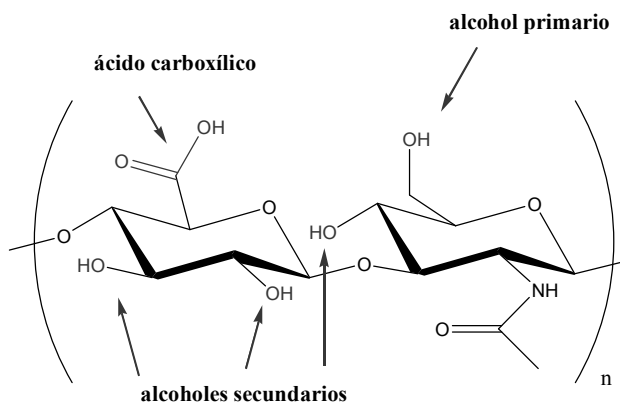
de dos tipos de enzimas posibles a) y b), tal y como se representa en el Esquema 1:

- 5 a) Hidrólisis con una hialuronidasa (hialuronato 4-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.35). La hidrólisis se produce en los enlaces β -1-3 del polímero de HA y resulta en estructuras del tipo D-GlcA-(1 \rightarrow 3)-[D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcA]_n-D-GlcNAc con un ácido urónico saturado en el extremo hidrolizado. Los oligosacáridos se preparan mediante la digestión de polímero de HA con BTH ("Bovine Testicular Hyaluronidase") (30 U/mg HA) a 37 °C y diferentes tiempos de reacción según se describe en la literatura (Bertrand, P. and B. Delpech (1985), "Interaction of hyaluronectin with hyaluronic acid oligosaccharides." J Neurochem 45(2): 434-9; Courel, M. N., C. Maingonnat, et al. (2002). "Importance of hyaluronan length in a hyaladherin-based assay for hyaluronan." Anal Biochem 302(2): 285-90.; Tawada, A., T. Masa, et al. (2002). "Large-scale preparation, purification, and characterization of hyaluronan oligosaccharides from 4-mers to 52-mers." Glycobiology 12(7): 421-6). El tamaño de oligosacárido final varía en función del tiempo de incubación.
- 10 b) Hidrólisis con una hialuronato liasa (E.C. 4.2.2.1). La hidrólisis se produce en los enlaces β -1-4 y se obtienen oligosacáridos con un ácido urónico Δ 4-insaturado en el extremo hidrolizado para dar oligosacáridos de estructuras L-4dthrHex4enA-(1 \rightarrow 3)-[D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcA]_n-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc.



Esquema 1

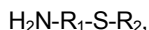
20 A continuación en el procedimiento A tiene lugar la etapa (ii) en la que los fragmentos oligómeros de diferentes tamaños resultantes de la degradación enzimática se purifican, opcionalmente, mediante una serie de técnicas convencionales tales como centrifugación, cromatografías, desalinización y liofilización. Posteriormente los fragmentos oligómeros purificados se derivatizan (iii) por reacción química con un enlazador. La derivatización de los mismos se lleva a cabo por modificación de uno de los dos tipos de grupos funcionales siguientes: los grupos ácido carboxílico (COOH) o los alcoholes (OH), tanto primarios como secundarios, de la unidad disacárido señalados en el Esquema 2:



Esquema 2

Los grupos ácido carboxílico (COOH) del ácido glucurónico presente a lo largo del oligómero de HA se pueden derivatizar con un enlazador mediante la formación de dos tipos de enlace como se representa en el Esquema 3:

- 5 1) Mediante la formación de un enlace amida (empleando el método de la activación con carbodiimida) con un enlazador que contiene un grupo amina de fórmula general:

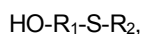


donde

- 10 R_2 representa un grupo seleccionado entre
H, $-\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}=\text{CH}_2$ y $-\text{S-R}_1-\text{NH}_2$ y
 R_1 representa un grupo seleccionado de entre
 $-(\text{CH})_n-$, $-(\text{CH})(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{NH-CO}-(\text{CH}_2)_n-$, donde n representa un número entero comprendido entre 1 y 20;

15 Véase ejemplos en los siguientes documentos: (Shu, X. Z., Y. Liu, et al. (2002). "Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels." *Biomacromolecules* 3(6): 1304-11; Lee, H., S.-H. Choi, et al. (2006). "Direct Visualization of Hyaluronic Acid Polymer Chain by Self-Assembled One-Dimensional Array of Gold Nanoparticles." *Macromolecules* 39(1): 23-25; Kafedjiiski, K., R. K. Jetti, et al. (2007). "Synthesis and in vitro evaluation of thiolated hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery." *Int J Pharm* 343(1-2): 48-58).

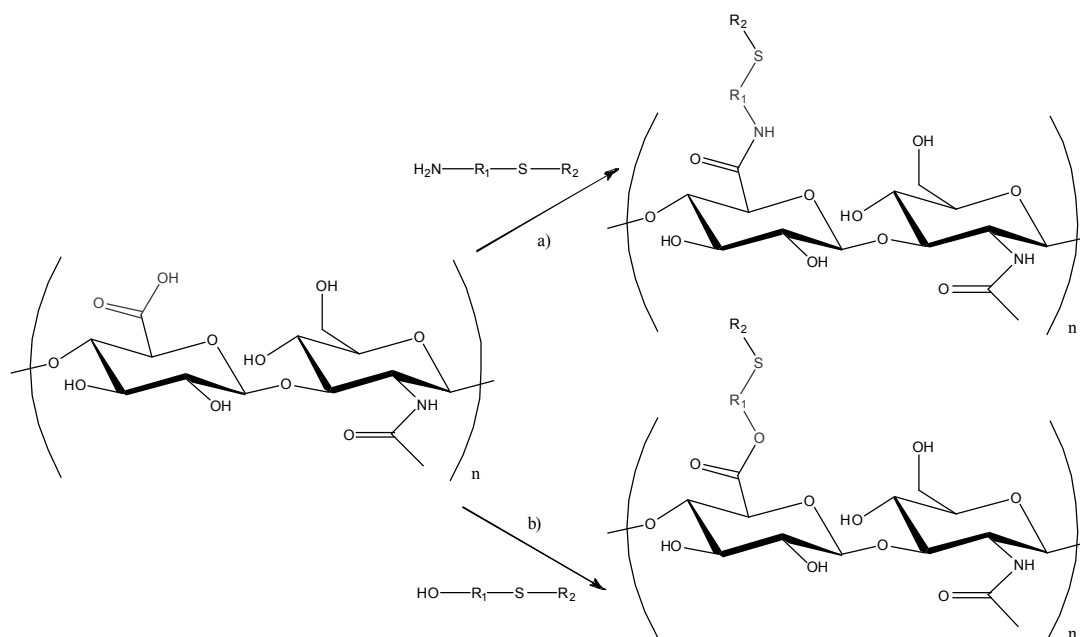
- 20 2) Mediante una reacción de esterificación empleando un enlazador que comprende un grupo alcohol de fórmula general:



donde

- 25 R_2 representa un grupo seleccionado entre
H, $-\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}=\text{CH}_2$ y $-\text{S-R}_1-\text{NH}_2$ y
 R_1 representa un grupo seleccionado de entre
 $-(\text{CH})_n-$, $-(\text{CH})(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n-$, donde n es un valor comprendido entre 1 y 20;

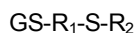
(Véase ejemplos)(Campocchia, D., P. Doherty, et al. (1998). "Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification." *Biomaterials* 19(23): 2101-27).



Esquema 3

Los alcoholes (OH), tanto primarios como secundarios, de la unidad disacárido (Esquema 2), se pueden derivatizar con un enlazador de fórmula general:

5



donde

R_2 representa un grupo seleccionado entre H, $-CH_3$, $-(CH_2)_n-CH_3$, $-(CH_2)_n-CH=CH_2$ y $-S-R_1-NH_2$ y

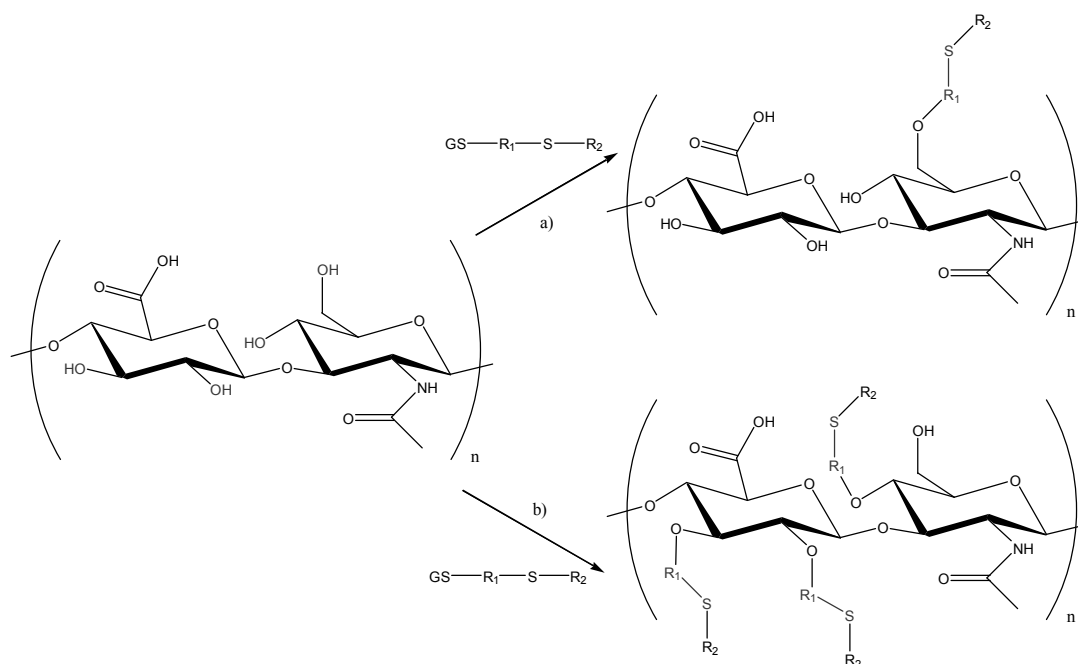
10

R_1 representa un grupo seleccionado de entre $-(CH)_n-$, $-(CH)(COOH)(CH_2)_n-$, donde n representa un número entero comprendido entre 1 y 20; y GS representa un grupo saliente

mediante la formación de enlaces tipo éter como se representa en el Esquema 4. (Véase ejemplos en: Mlcochova, P., V. Hajkova, et al. (2007). "Preparation and characterization of biodegradable alkylether derivatives of hyaluronan." Carbohydrate Polymers 69(2): 344-352)

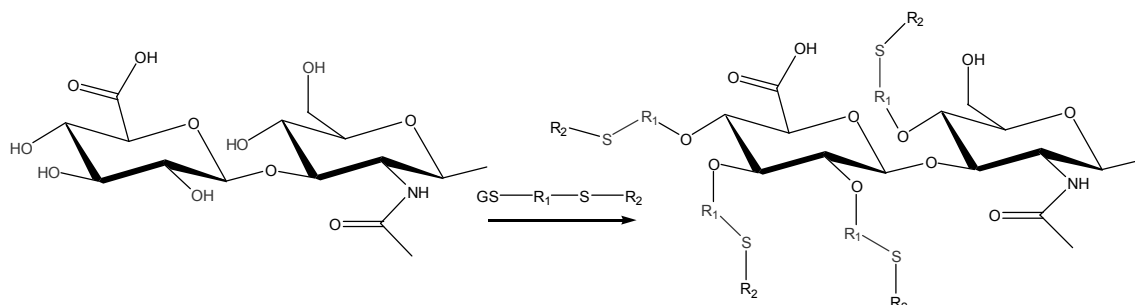
15

Variando las condiciones de reacción como la proporción de los reactivos, cantidad y/o tipo de disolvente, pH, temperatura y el tiempo de reacción, se puede controlar que el alcohol primario frente a los alcoholes secundarios se funcionalice mayoritariamente, así como la cantidad de mono-, di- o tri-substitución de los alcoholes secundarios.



Esquema 4

5 Asimismo, en el caso de los diferentes fragmentos de oligómeros provenientes de la degradación enzimática con Hialuronidasa, aparece un alcohol secundario adicional situado en el extremo hidrolizado de la unidad de disacárido terminal, el cual también es proclive a ser derivatizado en condiciones similares a las de los otros alcoholes secundarios según se representa en el siguiente Esquema 5:



Esquema 5

10 En la etapa (iv) del procedimiento A, se conjuga al menos uno de los fragmentos oligómeros de HA derivatizados, a, al menos, una nanopartícula metálica. Para la reacción de conjugación una disolución acuosa con una concentración generalmente en torno a 10¹² de nanopartículas metálicas por mililitro, se agita típicamente en presencia de un gran exceso del oligómero de HA derivatizado en cuestión, a temperatura ambiente durante 1 hora. La proporción de oligómero de HA respecto a la concentración de nanopartículas metálicas se calcula de la siguiente forma: a) se calcula el número de átomos metálicos que hay en la superficie de una esfera, mediante el cálculo teórico del área superficial de la misma, y asumiendo que cada átomo ocupa 1-2 nm². Se asume que cada átomo de azufre del enlazador se conjuga con un solo átomo de la nanopartícula metálica. Teniendo en cuenta el número de nanopartículas metálicas en disolución se añade un exceso de 100 veces más de oligómero de HA derivatizado.

15 El compuesto conjugado obtenido se purifica y se aísla a continuación por diálisis según la metodología descrita en el ejemplo 2.1.4.

20 Los procedimientos B) y C) de la invención se llevan a cabo de forma sencilla por un experto en la materia modificando el orden de las etapas de reacción (i) a (iv) del procedimiento A), a la vista del contenido de la presente descripción y el conocimiento del experto en la materia.

Otro procedimiento adicional, de obtención de un compuesto conjugado es el procedimiento D), que comprende:

(i) hidrólisis enzimática de un polímero de HA derivatizado con un enlazador que comprende un grupo -S-

través de al menos un enlace químico amida, éster o éter;

- (ii) obtención de los fragmentos oligómeros de HA derivatizados; y
- (iii) conjugación de al menos un fragmento oligómero de HA derivatizado obtenido en la etapa anterior a una nanopartícula metálica.

5 El procedimiento E) de preparación de un compuesto conjugado comprende:

- (i) conjugación de un polímero de HA derivatizado con un enlazador que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter a al menos una nanopartícula metálica;
- (ii) hidrólisis enzimática del producto resultante de la etapa anterior; y
- (iii) obtención del compuesto conjugado.

10 En una realización preferente tanto del procedimiento D) como del procedimiento E) de la presente invención, se parte de un polímero de HA previamente derivatizado, obtenible de forma comercial, como por ejemplo el Glycosil™ (Glycosan Biosystems Inc., ver Ejemplo 1). El Glycosil™ puede por tanto conjugarse a una nanopartícula metálica en primer lugar, y a continuación ser hidrolizado para generar fragmentos oligómeros de HA derivatizados y unidos ya a la nanopartícula metálica (procedimiento E)). Alternativamente, el Glycosil™ puede hidrolizarse primero para generar fragmentos oligómeros de HA derivatizados que posteriormente se conjugan a una nanopartícula metálica (procedimiento D).

20 De acuerdo con el procedimiento F) de obtención de un compuesto conjugado, los oligómeros de HA de hasta 1000 kDa, se obtienen mediante biosíntesis, mediante la acción de una Hialuronato Sintasa de manera convencional tal y como se describe en el estado de la técnica. Véanse los ejemplos en: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2005, 71, No. 7, p. 3747-3752; JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 278, No. 37, pp. 35199-35203, 2003; JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 279, No. 40, pp. 42345-42349, 2004; JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 280, No. 10, pp. 8813-8818, 2005). Después de la biosíntesis de los oligómeros de HA, éstos se derivatizan mediante cualquiera de los métodos y enlazadores descritos en la presente invención. Finalmente, los oligómeros de HA derivatizados se conjugan a, al menos, una nanopartícula metálica según la metodología descrita en esta invención.

25 Según una realización particular, los oligómeros biosintetizados de HA de hasta 1000 kDa, se derivatizan a través del grupo -OH de la posición 3 o 4 del sacárido inicial o final del oligómero con un enlazador de fórmula general GS-R₁-S-R₂.

Por último, mediante el procedimiento G, se puede preparar un compuesto conjugado que comprende:

- 30 - una nanopartícula metálica; y
- al menos un polímero u oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica, con la condición de que cuando el polímero u oligómero de HA presenta un número de monómeros n, y n > 1000, y la nanopartícula es una nanopartícula de oro con un tamaño de 20 nm, el enlazador es distinto de H₂N-CH₂-CH₂-SH.

El Procedimiento G comprende las siguientes etapas:

- (i) partir de un polímero u oligómero de HA,
- (ii) derivatizarlo con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter;
- 40 (iii) conjugar un polímero u oligómero de HA derivatizado a una nanopartícula metálica, y
- (iv) obtener el compuesto conjugado.

El procedimiento G se caracteriza, por la ausencia de una etapa de hidrólisis enzimática. El polímero u oligómero de HA de partida para el procedimiento G, se obtiene de cualquier fuente biológica de HA de diversas empresas comercializadoras. La derivatización se lleva a cabo por modificación de uno de los dos tipos de grupos funcionales: los grupos ácido carboxílico (COOH) o los alcoholes (OH), tanto primarios como secundarios, de acuerdo con cualquiera de los métodos arriba descritos. A continuación se lleva a cabo la etapa de conjugación siguiendo la metodología ya descrita.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con un compuesto conjugado que se puede obtener mediante al menos uno de los procedimientos descritos arriba.

Los diversos compuestos conjugados se pueden obtener fácilmente por un experto en la materia a la vista del contenido de la presente descripción, de los Ejemplos, y del conocimiento general común variando los parámetros anteriormente descritos, como por ejemplo, el tamaño de las nanopartículas metálicas utilizadas, los oligómeros, el tipo de enlazador, así como de las condiciones de reacción.

- 5 En otro aspecto adicional la invención se relaciona con un compuesto multiconjugado, en adelante compuesto multiconjugado de la invención, que comprende:
- una nanopartícula metálica; y
 - al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une la molécula de HA derivatizada a la nanopartícula metálica, y
 - 10 - al menos, una molécula conjugada con, al menos, una nanopartícula metálica.

Entre las distintas moléculas que pueden emplearse en la presente invención cabe destacar, por ejemplo y entre otras, un péptido, una proteína, un inhibidor de la hidrólisis del HA. En una realización particular de la invención dicha molécula es un compuesto seleccionado del grupo formado por los inhibidores de la hidrólisis del HA producida por una enzima de la familia de hialuronidasas.

El compuesto multiconjugado de la invención, que comprende además otra molécula conjugada adicional, puede obtenerse fácilmente mediante técnicas de multiconjugación de moléculas a la superficie de una nanopartícula metálica conocidas para un experto en la materia. Cada molécula a conjugar a la nanopartícula metálica se derivatiza previamente con un enlazador determinado. Las técnicas de multiconjugación se basan en la diferencia de afinidad del enlazador por el cual se ha derivatizado cada tipo de molécula y a la diferencia en concentración de cada tipo de molécula en la reacción de conjugación a la nanopartícula metálica.

En otro aspecto adicional la invención se refiere a una composición cosmética que comprende al menos un compuesto seleccionado entre:

un compuesto conjugado que comprende:

- 25 - una nanopartícula metálica; y
- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica, o

30 un compuesto multiconjugado de la invención, junto con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable. Dichos excipientes pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la materia en función, entre otros aspectos, de las propiedades y características del compuesto conjugado concreto. La composición cosmética puede prepararse para su aplicación tópica o para su aplicación mediante inyección.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al empleo de al menos un compuesto seleccionado entre:

un compuesto conjugado que comprende:

- 35 - una nanopartícula metálica; y
- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une un oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica, o

40 un compuesto multiconjugado de la invención, en la preparación de una composición cosmética, en particular para su aplicación tópica o para su aplicación mediante inyección en la piel.

Por tanto otro aspecto adicional de la invención, se refiere a un tratamiento cosmético de la piel de un humano que comprende la aplicación de la composición cosmética de la presente invención.

El tratamiento cosmético presenta ventajas con respecto a los tratamientos cosméticos del estado de la técnica basados en HA en cuanto a que mejora la estructura física y la estabilidad del HA. El compuesto conjugado absorbe agua en las capas profundas de la piel realizando el efecto de relleno necesario para atenuar las arrugas y pliegues.

La unión del oligómero de HA a la nanopartícula metálica parece proteger a los oligómeros de HA de su absorción directa por el organismo y permite suministrar HA en grandes concentraciones, por concentrar en un solo compuesto conjugado varios oligómeros de HA. Sin querer verse ligados a ninguna teoría, los inventores consideran que los mecanismos por los que la conjugación a una nanopartícula metálica protege al HA de ser absorbido, podrían ser los

siguientes:

Por una parte, la estructura de los oligómeros de HA que recubren la nanopartícula metálica presenta una distribución espacial que es menos reactiva frente al metabolismo de absorción.

5 Por otra parte, la competencia entre el enlace a través de un enlazador, del oligómero de HA-nanopartícula metálica, frente a las reacciones que lo degradarían, desplaza el equilibrio bioquímico alargando la vida media del HA.

Finalmente, en el caso de un oligómero conjugado con una nanopartícula metálica por varias posiciones, se obtiene un efecto de cross-linking debido a la distribución del oligómero sobre la superficie de la nanopartícula metálica por haberse unido a ella por varias posiciones. Esto podría dificultar aún más la acción de la hialuronidasa aumentando por tanto la estabilidad y durabilidad del HA.

10 De nuevo y sin querer verse vinculados a ninguna teoría los inventores opinan que es posible, cuando el oligómero se vea expuesto a degradación enzimática (normalmente hialuronidasa), el compuesto conjugado podría proteger químicamente las partes del HA hábiles de degradarse por la actividad del enzima ya que la nanopartícula metálica se conjuga por un lugar estructural cercano al grupo funcional por el que dicho enzima fragmenta al oligómero. De este modo se dificultaría la acción de la hialuronidasa sobre el oligómero de HA.

15 En una realización particular el tratamiento cosmético es tópico, y presenta entre otras ventajas el hecho de que es accesible a todo individuo en el sentido de que, él mismo lo puede poner en práctica sobre la piel sin riesgo alguno, siendo indoloro, cómodo y más asequible económicamente que un tratamiento mediante inyección. El compuesto conjugado o multiconjugado diseñado para su aplicación tópica comprende, preferiblemente, oligómeros de HA de un peso molecular inferior a 1000 kDa que pueden penetrar fácilmente hasta la dermis. De este modo el oligómero de HA
20 conjugado absorbe agua en las capas profundas de la piel realizando el efecto de relleno necesario para atenuar las arrugas y pliegues.

En otra realización particular el tratamiento cosmético es mediante inyección y presenta asimismo algunas ventajas. En este sentido, mientras que los tratamientos actuales mantienen su efectividad entre 4 y 6 meses, después de los cuales desaparece el efecto de relleno, la conjugación de oligómeros de HA a nanopartículas mejora la estabilidad
25 del oligómero de HA, obteniendo un producto que mantiene su efecto corrector de arrugas y pliegues durante más tiempo, haciendo posible espaciar la necesidad de los tratamientos inyectados y mejorando así la calidad de vida del usuario. En una realización particular, el compuesto conjugado o multiconjugado diseñado para su aplicación mediante inyección comprende, preferiblemente, oligómeros de HA de un peso molecular superior a 500 kDa ya que una vez inyectados en las capas profundas de la piel, su durabilidad es mayor.

30 A continuación se presentan ejemplos ilustrativos de la presente invención que se exponen para facilitar la comprensión de la invención y en ningún caso deben considerarse una limitación del alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1: obtención de un compuesto conjugado

Ejemplo 1.1: síntesis de nanopartículas de oro

35 Una disolución acuosa (150 ml) de citrato de sodio (2,2 mM) se calentó a ebullición con agitación vigorosa. El siguiente paso fue añadir 1 ml de una disolución acuosa (23,4 mM) de HAuCl_4 sobre la disolución a ebullición. La reducción tuvo lugar en aproximadamente 2 minutos y se formó una disolución de nanopartículas de oro, la cual experimentó un cambio de color indicativo de violáceo a rojo intenso. Finalmente se separó el reactor de la fuente de calor y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Las nanopartículas de oro así obtenidas se caracterizaron mediante UV-Vis. El
40 tamaño medio de las nanopartículas de oro, 8 nm, se determinó mediante tratamiento informático de las imágenes obtenidas por TEM; asimismo se midió el diámetro de una muestra aleatoria de nanopartículas y se realizó la distribución gaussiana de tamaños.

Ejemplo 1.2: Funcionalización de nanopartículas de oro con oligómero (21-monómeros) de HA derivatizado

1.2.1 Hidrólisis enzimática de tiopropionilhidrazida-HA (polímero de HA derivatizado)

45 Tiopropionilhidrazida-HA (Glycosil™, Glycosan Biosystems Inc.) se despolimerizó mediante la acción del enzima hialuronato 4-glucanohidrolasa ("Bovine Testicular Hyaluronidase (BTH)) (E.C. 3.2.1.35) (Hyaluronidase Type I-S, Sigma-Aldrich). A una solución que contenía 5 mg de oligómeros de tiopropionilhidrazida-HA en 25 ml de disolución tampón acuosa (100 mM fosfato de sodio, 150 mM cloruro de sodio, pH 5,3) se le añadieron $5 \cdot 10^4$ U de BTH y se dejó
50 incubar durante 40 horas a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo mediante la ebullición de la muestra durante 20 min. (Glycobiology, 2002 Jul;12(7):421-6).

1.2.2 Purificación de los oligómeros de HA derivatizados

La mezcla de oligómeros de HA-derivatizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min y el sobrenadante se concentró

y liofilizó. A continuación, la muestra liofilizada se reconstituyó en agua destilada. (Glycobiology, 2002 Jul;12(7):421-6).

Ejemplo 1.3 Conjugación de nanopartículas de oro a oligómeros (21-monómeros) de HA derivatizado

5 Las nanopartículas de oro de 8 nm obtenidas según el Ejemplo 1.1, se funcionalizaron con los oligómeros derivatizados (tiopropionilhidrazida-HA, MW 1455 g/mol) obtenidos en la etapa anterior, mediante la adición de 100 µl de una disolución 1,5 mM de oligómero derivatizado por 5 ml de disolución de nanopartículas de oro. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación magnética durante 30 minutos. La reacción se paró disminuyendo la temperatura (dentro de la nevera). La purificación se hizo por diálisis (molecular weight cut off (MWCO) 16 mm) contra citrato de sodio (2,3 mM, 3,25 g/5 l H₂O). Se obtuvo el compuesto conjugado

Ejemplo 1.4 Caracterización del compuesto conjugado obtenido

10 1.4.1 Espectro de UV-Vis

Se registraron los espectros de absorción de UV-Vis de la disolución del compuesto conjugado y purificado obtenido en la etapa anterior. La conjugación a una nanopartícula de los oligómeros de HA derivatizado, induce a un desplazamiento del pico de absorción a una longitud de onda mayor (en este caso a 522 nm) como se muestra en la Figura 7 con respecto al pico de absorción de las nanopartículas de oro no conjugadas (519 nm).

15 1.4.2 Visualización del compuesto conjugado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Se capturaron las imágenes de TEM del compuesto conjugado (Figura 6) obtenido. Las muestras para estudios de TEM fueron preparadas depositando una gota de la disolución acuosa del compuesto conjugado y purificado obtenido sobre rejillas de TEM recubiertas de una membrana carbono.

1.4.3 Espectro de Potencial Z del compuesto conjugado

20 Se determinó el potencial-Z del compuesto conjugado. La conjugación a una nanopartícula de los oligómeros de HA derivatizado induce a un desplazamiento del pico de potencial Z a -19,1 mV como se muestra en la Figura 8 con respecto al pico de -50,8 mV correspondiente a las nanopartículas de oro no conjugadas.

Ejemplo 2: Obtención de un compuesto conjugado

Ejemplo 2.1: Funcionalización de nanopartículas de oro con oligómeros de HA

25 2.1.1 Hidrólisis enzimática de un polímero de HA

El polímero de HA (HA, sal de sodio, de Streptococcus eq., Sigma-Aldrich) se despolimerizó mediante la acción del enzima ("Bovine Testicular Hyaluronidase (BTH)" hialuronato 4-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.35) (Hyaluronidase Type I-S, Sigma-Aldrich). A una solución que contenía 5 mg de HA en 25 ml de disolución tampón acuosa (100 mM fosfato de sodio, 150 mM cloruro de sodio, pH 5,3) se le añadieron $5 \cdot 10^4$ U de BTH y se agitó durante 40 horas a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo mediante la ebullición de la muestra durante 20 minutos. (Glycobiology, 2002 Jul; 12(7):421-6).

2.1.2 Purificación de los oligómeros de HA

35 La mezcla de fragmentos oligómeros de HA se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se concentró y liofilizó. A continuación, los oligómeros de HA se purificaron mediante tubos de centrifugación Centricon Plus 20 con un corte de peso molecular de 10 kDa. Finalmente, se obtuvo una mezcla de oligómeros de HA de tamaños comprendidos entre 2 y 26 monómeros (Glycobiology, 2002 Jul;12(7):421-6) que fue utilizada en la etapa siguiente.

2.1.3 Derivatización de los oligómeros (21-monómeros) de HA

40 Los grupos carboxilo (-COOH) libres del ácido glucurónico presentes a lo largo de la cadena se derivatizaron con un "enlazador" mediante la formación de un enlace amida empleando el método de la carbodiimida. El oligómero de HA (8 kDa) (0,1 g, aprox. 12,5 mmol) fue disuelto en 25 ml de agua destilada, agitado durante 30 minutos y luego el pH fue ajustado a 5-5,5 con HCl 0,1 N (algunas veces dependiendo de la casa comercial de la que se adquiere el HA no hay necesidad de ajustar el pH porque el pH ya está por debajo de 5). Un exceso de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) (0,25 g) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (0,15 g) fueron añadidos (el pH fue ajustado a 5,5 cuando fue necesario) y la reacción se agitó por 30 minutos más. Se añadió una cantidad de cistamina HCl igual a 0,3 g (el pH cambió a 4,3) y la reacción se agitó toda la noche aprox. 12 horas. Finalmente se añadió ditiotreititol (DTT) (0,31 g) y la reacción se agitó por 2 horas más. La mezcla de la reacción resultante se dializó exhaustivamente con una membrana de diálisis de corte de peso molecular de 3500 Da contra (i) NaCl (30g, 100 mM) + HCl 0,1 N (15 ml, 0,3 mM) (4 días) y (ii) HCl 0,1 N (15 ml, 0,3 mM) (4 días) y finalmente contra agua destilada y desmineralizada (2 días).

50 2.1.4 Conjugación de nanopartículas de oro a oligómeros (21-monómeros) de HA derivatizados

5 Las nanopartículas de oro de 8 nm obtenidas en el Ejemplo 1.1 se conjugaron con los oligómeros (21-monómeros) derivatizados obtenidos en 2.1.3, mediante la adición de 100 µl de una disolución 1,5 mM de oligómeros derivatizados por 5 ml de disolución de nanopartículas. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación magnética durante 30 minutos. La reacción se paró disminuyendo la temperatura a 4°C. La purificación se hizo por diálisis (MWCO 16 kDa) contra citrato de sodio (2,3 mM, 3,25 g/5 l H₂O).

Ejemplo 3: Obtención de un compuesto conjugado

Ejemplo 3.1: Conjugación de nanopartículas de oro a un polímero de HA derivatizado

10 Las nanopartículas de oro de 8 nm se conjugaron con un polímero de HA derivatizado, mediante la adición de 100 µl de una disolución 1,5 mM de tiopropionilhidrazida-HA (Glycosil TM) por 5 ml de disolución de nanopartículas de oro. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación magnética durante 30 minutos (Macromolecules 2006, 39, 23-25). La reacción se paró disminuyendo la temperatura a 4°C.

Ejemplo 3.2 Caracterización del compuesto conjugado

3.2.1 Visualización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

15 Se capturaron imágenes de TEM tanto de las nanopartículas de oro (Figura 10-A) como del conjugado (Figura 10-B) para mostrar la diferente morfología adoptada por el conjugado de nanopartícula de oro con polímero de HA. Las muestras para estudios de TEM fueron preparadas depositando una gota de la disolución acuosa correspondiente de nanopartículas de oro o del conjugado de HA-nanopartícula de oro, sobre rejillas de TEM recubiertas de carbono.

3.2.2 Espectro de UV-Vis

20 Se registraron los espectros de absorción de UV-Vis de las disoluciones de nanopartículas de oro y del compuesto conjugado obtenido. Las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato muestran un pico característico a 521,2 nm. Por otra parte, cuando se conjugan a HA se produce un desplazamiento del pico de absorción a una longitud de onda mayor en este caso a 523,8nm.

3.2.3 Espectro de Potencial Z del compuesto conjugado

25 Se determinó el potencial-Z. La conjugación a nanopartículas de los oligómeros de HA derivatizados induce a un desplazamiento del pico de potencial Z a -18,2 mV como se muestra en la Figura 12 con respecto al pico de -48,5 mV correspondiente a las nanopartículas de oro no conjugadas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto conjugado que comprende:
 - una nanopartícula metálica; y
 - al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica, con la condición de que cuando el oligómero de HA presenta un número de monómeros n, y $n > 1000$, y la nanopartícula es una nanopartícula de oro con un tamaño de 20 nm, el enlazador es distinto de $H_2N-CH_2-CH_2-SH$.
2. Compuesto conjugado según la reivindicación 1, en el que cada uno de los oligómeros de HA está derivatizado con un enlazador a través de un enlace químico, y en el que cada enlazador une cada oligómero de HA a la nanopartícula metálica.
3. Compuesto conjugado según la reivindicación 1, que presenta una estructura que comprende:
 - una nanopartícula metálica y uno o más oligómeros de HA, en la que cada uno de los oligómeros está derivatizado con al menos dos enlazadores los cuales unen cada oligómero de HA a la nanopartícula metálica.
4. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la nanopartícula metálica se selecciona de entre el grupo formado por nanopartículas y partículas núcleo-coraza y en el que la nanopartícula, el núcleo y la coraza pueden estar independientemente compuestos por un material seleccionado del grupo formado por los metales Au, Ag, Pt, Co, Fe, los óxidos derivados de cualquiera de los metales anteriores y TiO_2 .
5. Compuesto conjugado según la reivindicación 4, en el que la nanopartícula metálica es una nanopartícula de oro.
6. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en el que la nanopartícula metálica presenta un tamaño medio de diámetro comprendido entre 2 y 100 nm.
7. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligómero de HA está derivatizado a través de al menos un enlace químico amida -CONH-, formado entre un grupo ácido carboxílico de un mer de HA y un enlazador de fórmula general $H_2N-R_1-S-R_2$, en la que:
 - R_2 representa un grupo seleccionado entre H, $-CH_3$, $-(CH_2)_n-CH_3$, $-(CH_2)_n-CH=CH_2$ y $-S-R_1-NH_2$, preferiblemente seleccionado de H, $-CH_3$, $-CH_2-CH_3$, y $-CH_2-CH=CH_2$ y
 - R_1 representa un grupo seleccionado entre $-(CH)_n-$, $-(CH)(COOH)(CH_2)_n-$, $-NH-CO-(CH_2)_n-$, donde n representa un número entero comprendido entre 1 y 20, preferiblemente seleccionado de $-(CH)(COOH)(CH_2)_n-$, donde n es 1 o 2.
8. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligómero de HA está derivatizado según una de las siguientes alternativas:
 - a) a través de, al menos, un enlace químico éster -COO-, formado entre un grupo ácido carboxílico de un mer de HA y un enlazador de fórmula general $HO-R_1-S-R_2$, o
 - b) a través de, al menos, un enlace químico éter, -O- formado entre un grupo -OH del oligómero de HA y un enlazador de fórmula general $GS-R_1-S-R_2$, donde
 - R_2 representa un grupo seleccionado entre H, $-CH_3$, $-(CH_2)_n-CH_3$, $-(CH_2)_n-CH=CH_2$ y $-S-R_1-NH_2$, preferiblemente seleccionado de H, $-CH_3$, $-CH_2-CH_3$, y $-CH_2-CH=CH_2$ y
 - R_1 representa un grupo seleccionado entre $-(CH)_n-$, $-(CH)(COOH)(CH_2)_n-$, preferiblemente un grupo $-(CH)_n-$ donde n representa un número entero comprendido entre 1 y 20; y
 - GS representa un grupo saliente.
9. Procedimiento de preparación de un compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, seleccionado de los siguientes procesos:
 - (i) partir de un polímero u oligómero de HA,
 - (ii) derivatizarlo con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter;
 - (iii) conjugar un polímero u oligómero de HA derivatizado a una nanopartícula metálica, y

- (iv) obtener el compuesto conjugado, en el que las etapas ii) e iii) se pueden llevar a cabo en cualquier orden y en el que el polímero de HA es el compuesto de partida de una etapa de hidrólisis enzimática que se lleva a cabo después de la etapa i) o etapa ii) o etapa iii).
- 5 10. Procedimiento según se define en la reivindicación 9, que comprende la etapa de biosíntesis de un fragmento oligómero de HA mediante la acción de una hialuronato sintasa antes de la etapa (i).
11. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende, además, al menos, otra molécula conjugada con la nanopartícula metálica.
12. Compuesto multiconjugado según la reivindicación 11, en el que la molécula es un compuesto seleccionado del grupo formado por péptidos, proteínas e inhibidores de la hidrólisis del HA.
- 10 13. Composición cosmética que comprende al menos un compuesto seleccionado entre:
un compuesto conjugado que comprende:
- una nanopartícula metálica; y
- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la
15 nanopartícula metálica, o
un compuesto multiconjugado según la reivindicación 11 o 12,
junto con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.
14. Composición cosmética según la reivindicación 13, adecuada para su aplicación tópica o para su aplicación mediante inyección.
- 20 15. Uso de al menos un compuesto seleccionado entre:
un compuesto conjugado que comprende:
- una nanopartícula metálica; y
- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un enlazador que comprende un grupo -S- por el que se une un oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula
25 metálica, o
un compuesto multiconjugado según la reivindicación 11 o 12,
en la preparación de una composición cosmética diseñada para su aplicación tópica o para su aplicación mediante inyección en la piel.

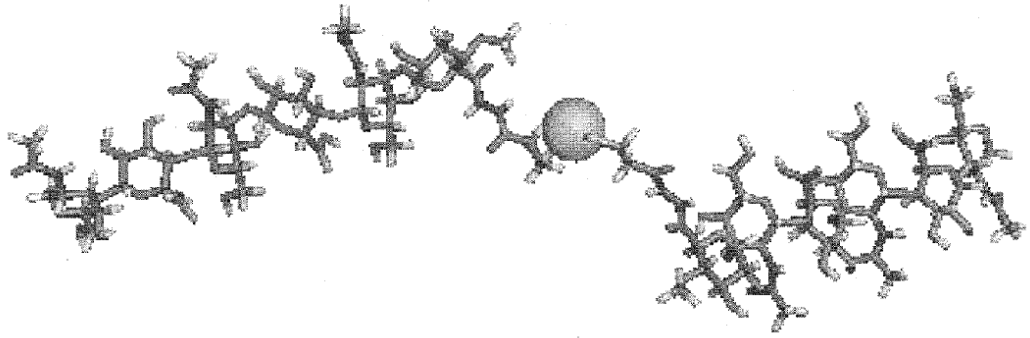


FIG. 1

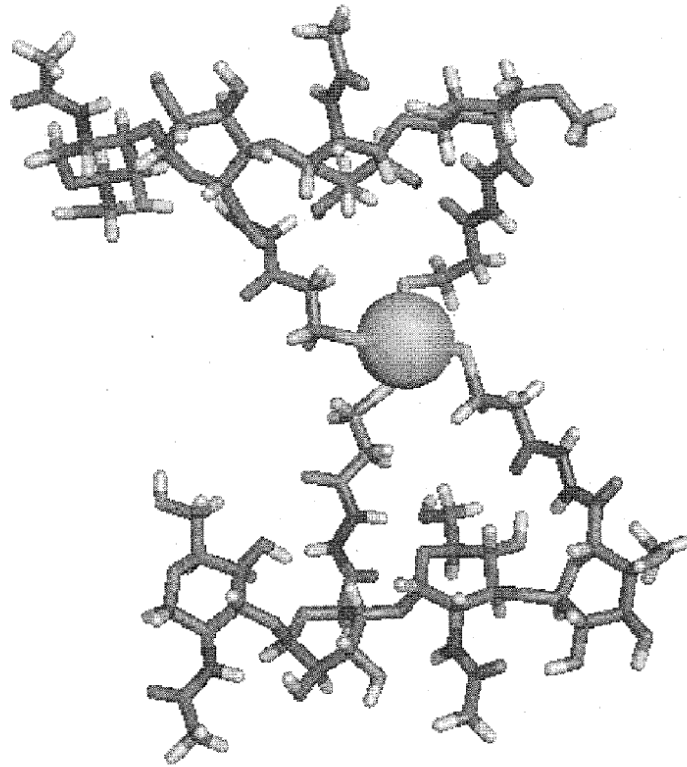


FIG. 2

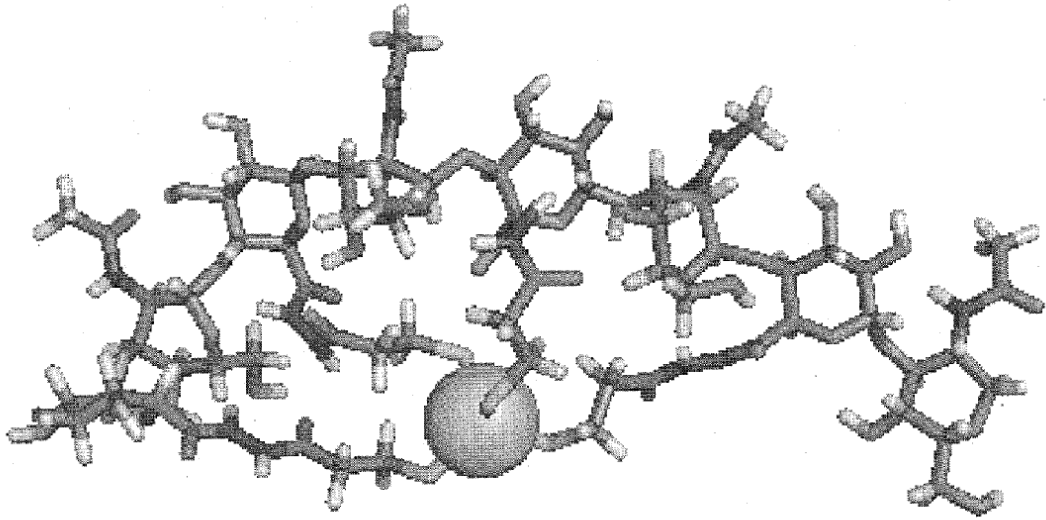


FIG. 3

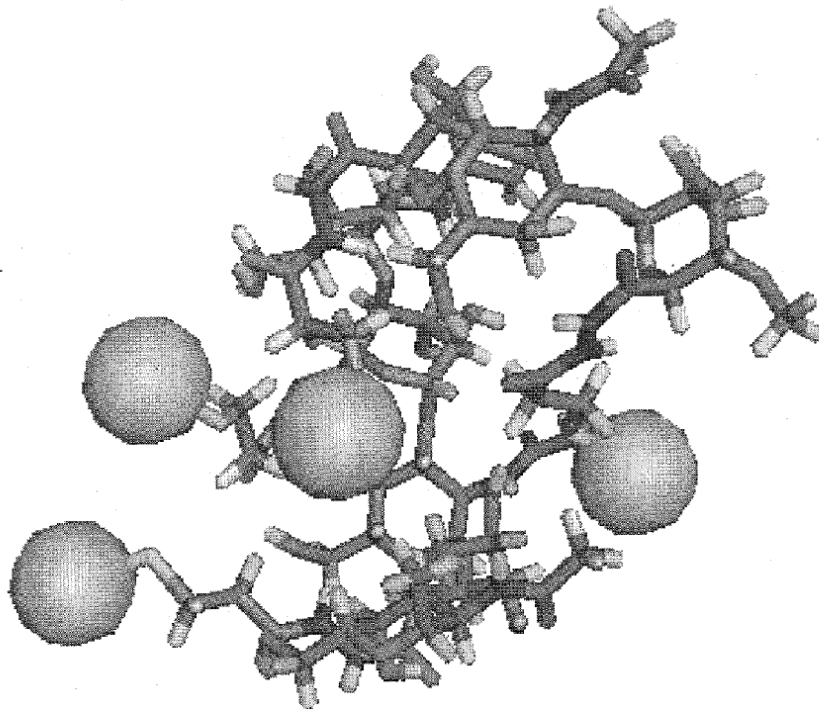


FIG. 4

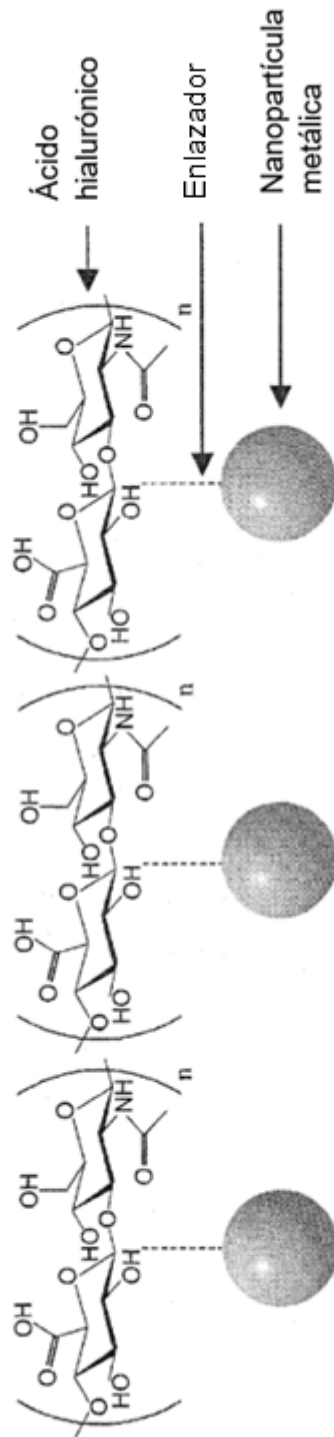


FIG. 5

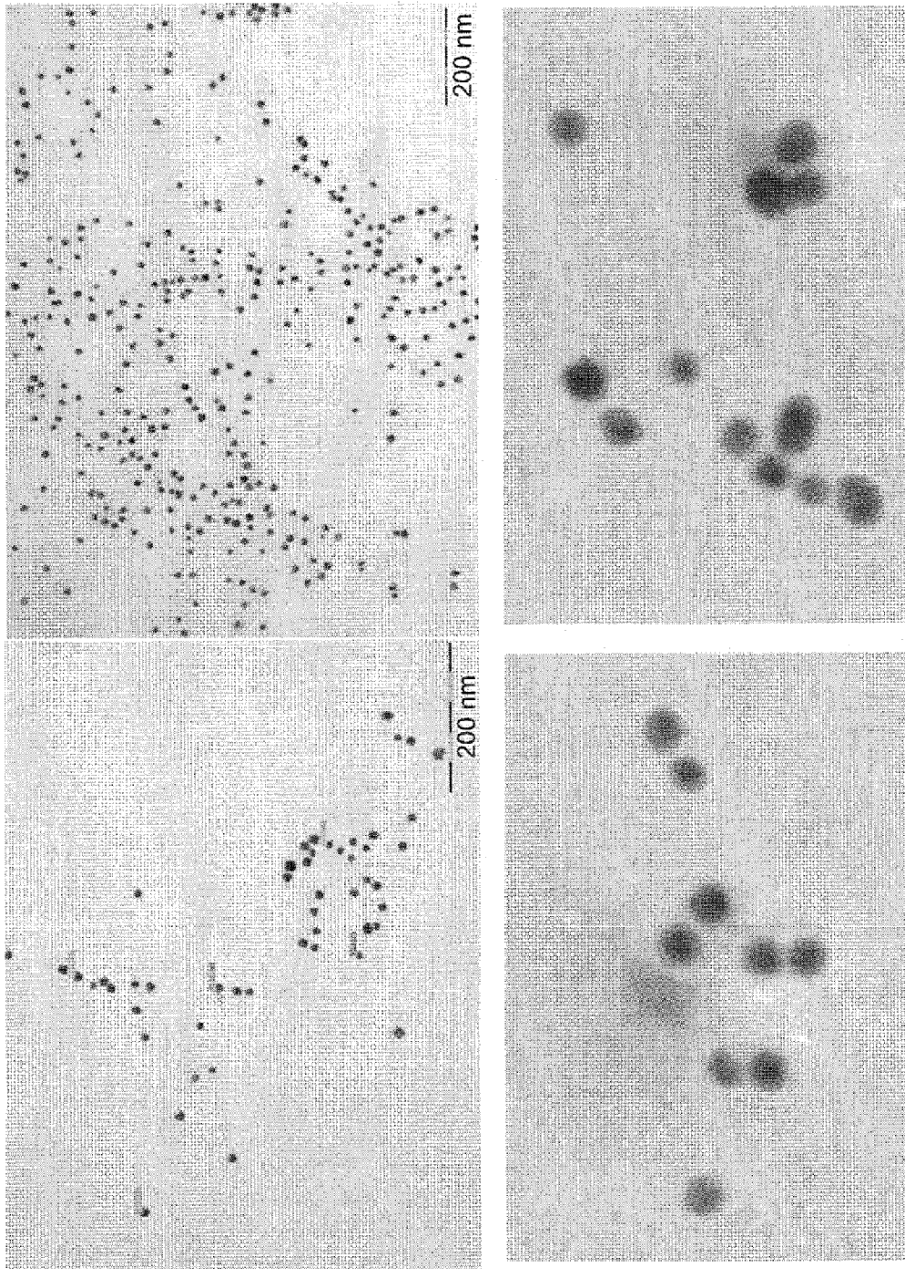


FIG. 6

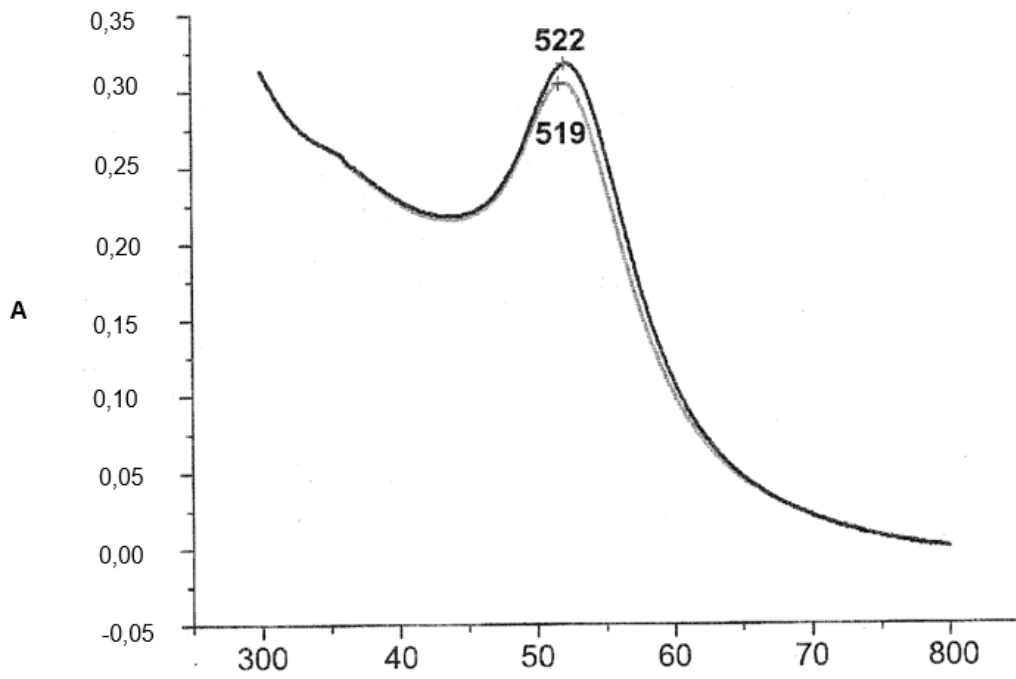


FIG. 7

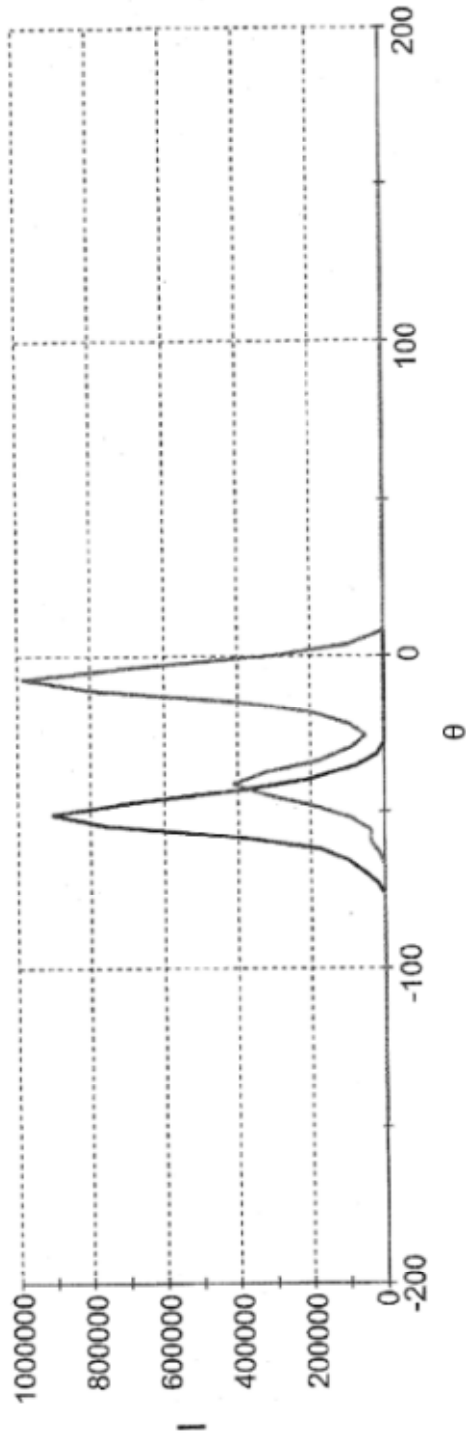
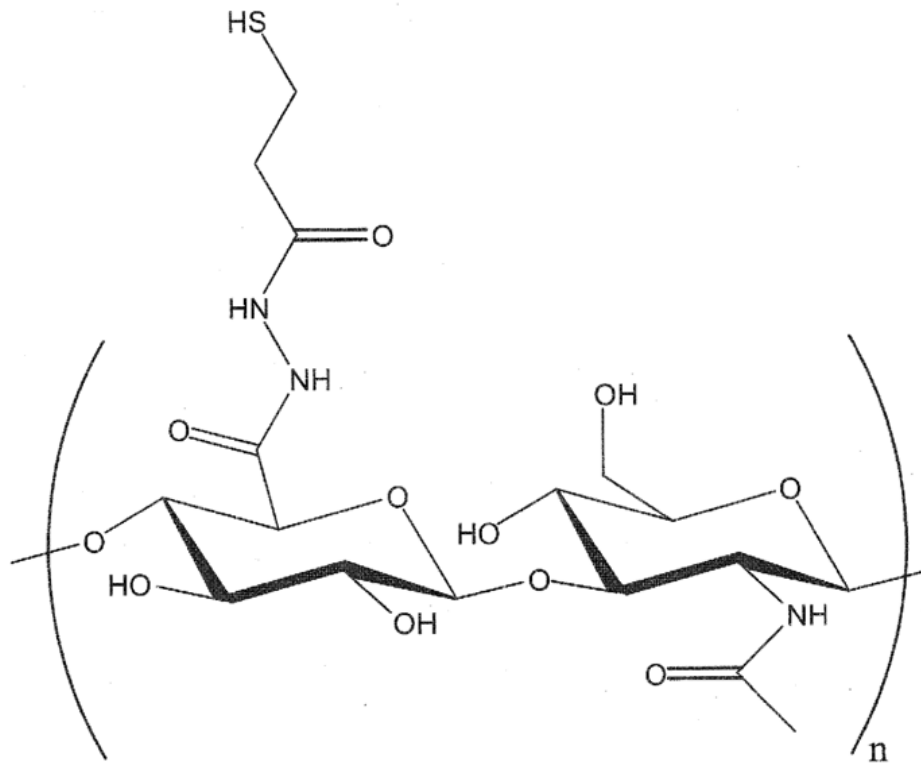


FIG. 8



tiopropionilhidrazida-HA

FIG. 9

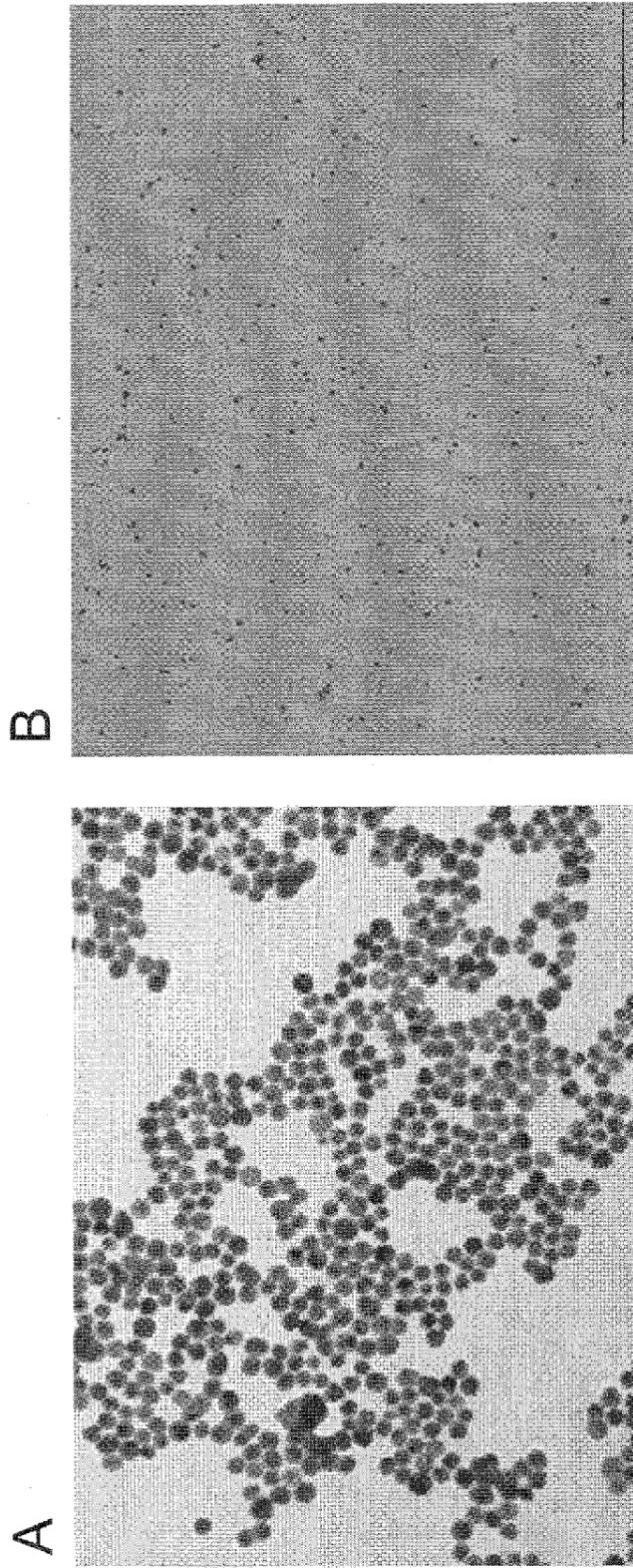


FIG. 10

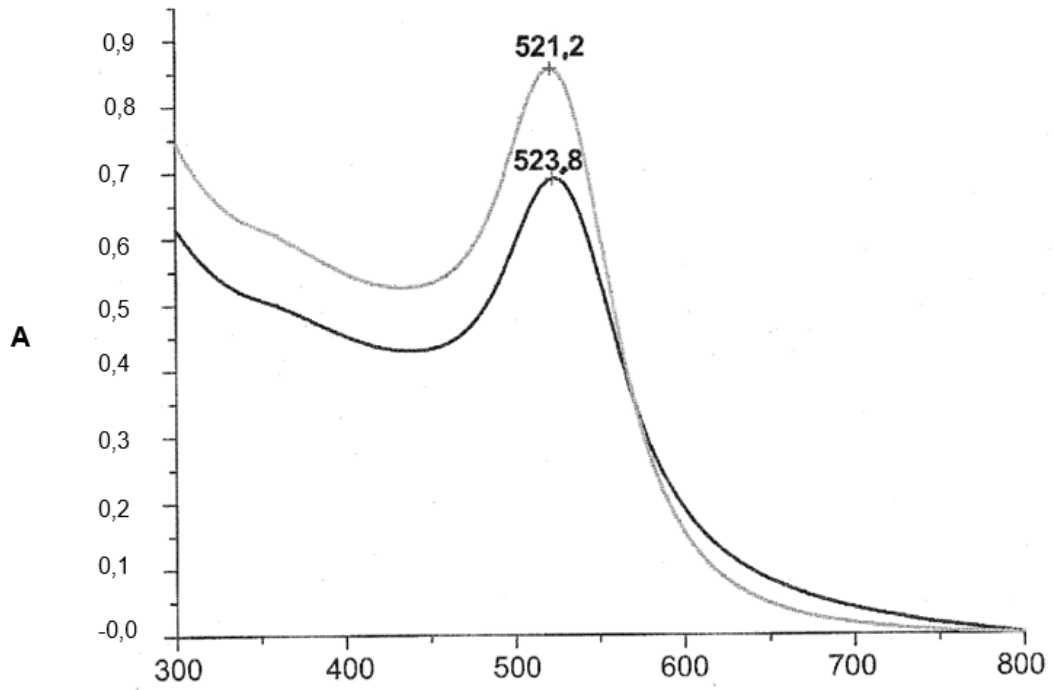


FIG. 11

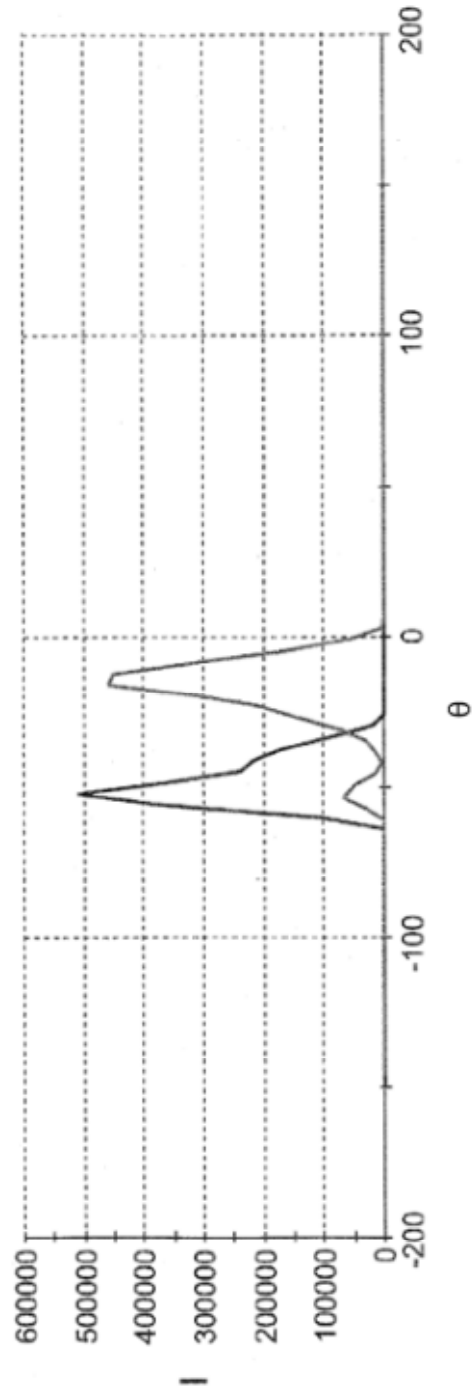


FIG. 12