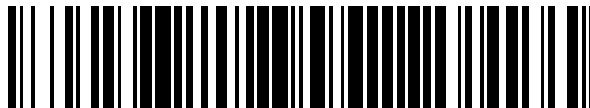


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 847**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2008 PCT/EP2008/009801**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2009 WO09068215**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2008 E 08855114 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2222713**

54 Título: **Ésteres fórmicos butíricos mezclados de polisacáridos ácidos, y su preparación y uso como cosméticos para la piel**

30 Prioridad:

27.11.2007 IT MI20072237

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

26.03.2018

73 Titular/es:

**SIGEA S.R.L. (100.0%)
AREA SCIENCE PARK PADRICIANO 99
34012 TRIESTE, IT**

72 Inventor/es:

**BOSCO, MARCO;
STUCCHI, LUCA;
GIANNI, RITA y
TREVISAN, ANTONIA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 660 847 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

Ésteres fórmicos butíricos mezclados de polisacáridos ácidos, y su preparación y uso como cosméticos para la piel

5 La presente invención divulga ésteres fórmicos butíricos mezclados de polisacáridos ácidos obtenidos mediante un procedimiento en el que el éster de formiato se origina a partir de formamida en presencia de anhídrido butírico y bases, su purificación y recuperación por diálisis y liofilización, su preparación y su uso como sustancias generadoras de elasticidad y humectantes para uso cosmético y de protección de la piel.

Estado de la técnica

10 En vista de sus características químico-físicas y biológicas, los glicosaminoglicanos (GAGs) son productos de gran interés en el campo de aplicación debido al papel crucial que desempeñan en áreas particulares del cuerpo humano, donde generalmente están presentes en forma de proteoglicanos. Dichas moléculas son sistemas complejos en los que las cadenas de polisacáridos pueden estar enlazadas covalentemente o no covalentemente a proteínas. Realizan múltiples funciones biológicas, que varían desde la regulación del agua en los tejidos, como moduladores de difusión de iones en la matriz extracelular, hasta la regulación de la motilidad celular y otras funciones, desde la participación en el sistema reproductivo hasta su actuación como una simple infraestructura.

15 El GAG que ha sido más estudiado y sometido a modificaciones químicas es el ácido hialurónico (HA).

20 En general, las modificaciones a HA se relacionan con el uso de nuevos derivados, principalmente en el sector biomédico, como biomateriales, liberación controlada de fármacos, productos de viscosuplementación, dispositivos antiadherentes postquirúrgicos, etc. En cosmética, se utiliza HA principalmente como un hidratante en forma nativa no modificada caracterizada por pesos moleculares específicos.

25 De acuerdo con la literatura, los mayores esfuerzos se han centrado recientemente en los procedimientos de entrecruzamiento de HA para obtener nuevas moléculas biocompatibles con características biológicas particulares (viscoelasticidad); por ejemplo, el documento EP 341745 describe productos obtenidos por entrecruzamiento automático de HA para usar en el tratamiento interarticular, mediante viscosuplementación, y también como dispositivos antiadherentes postquirúrgicos.

Otras patentes, tales como los documentos US 4582865 y 4713488, reivindican dichas propiedades, usando moléculas exógenas como agentes de entrecruzamiento.

Los derivados de éster con carboxilo se describen en el documento EP 216453 para el uso de HA modificado en el campo de los biomateriales y la liberación controlada de fármacos.

30 Hay muchas menos patentes relacionadas con los ésteres hidroxílicos de HA con ácidos orgánicos. Por ejemplo, el documento US 5679657 reivindica un acetilato de HA con un grado de sustitución de entre 0,6 y 3,6, a partir de HA con baja viscosidad y bajo peso molecular, para uso cosmético como agente de película; el documento US 60179011 reivindica el uso de derivados de éster hemisuccinato de HA para introducir cargas negativas adicionales en la cadena de polisacáridos.

35 El documento EP 941253 divulga la síntesis de derivados de HA con anhídrido butírico en un entorno básico, para obtener productos esterificados al nivel de las funciones hidroxilo.

40 Por lo que sabemos, no se conocen funcionalidades de otros GAGs para usos en el campo dermatológico/cosmético. La presencia simultánea de residuos de butirato y formiato como resultado del procedimiento de síntesis original utilizado y reivindicado no se describe en ninguno de los casos mencionados.

Descripción de la invención

45 La presente invención se refiere a derivados de polisacáridos ácidos total o parcialmente esterificados con ácidos butíricos y fórmicos en los grupos hidroxilo libres de polisacáridos ácidos pertenecientes a la familia de glicosaminoglicanos (GAG), en los que los polisacáridos ácidos se seleccionan de ácido hialurónico, sulfato de condroitina, dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato y en el que los derivados de polisacáridos ácidos se obtienen por un procedimiento que comprende:

a) disolver el polisacárido ácido, salificado con sodio u otros metales alcalinos, en formamida por calentamiento;

b) añadir a la solución resultante, a temperatura ambiente, una base orgánica, seguido, después de 15 minutos, de anhídrido butírico;

50 c) diluir la mezcla de reacción viscosa y homogénea con una solución acuosa de NaCl y neutralizarla a un pH de 6-7,5;

d) purificar la mezcla de reacción diluida por diálisis o filtración tangencial;

e) congelar la solución de polisacárido purificado y recuperar el producto por liofilización o secado por aspersión.

La invención también se refiere al procedimiento para la preparación de la misma.

5 Los productos de acuerdo con la invención son útiles en preparaciones tópicas (cosméticas o médicas) que poseen actividad hidratante, generadora de elasticidad, tonificante para la piel, antienvjecimiento y antiacné, y como adyuvantes en el tratamiento de lesiones cutáneas tales como inflamaciones, úlceras y lesiones por hipertermia inducidas por radiación como rayos UV, X y gamma.

10 El grado de sustitución (DS) de los grupos hidroxilo de cada monómero polisacárido puede variar, en el caso de ésteres butíricos entre 0,01 y 1*N, preferiblemente entre 0,01 y 0,2*N, donde N es el número de grupos de alcohol libres presentes en la unidad repetitiva, mientras que el grado de esterificación del ácido fórmico en los grupos hidroxilo del polímero está entre 0,01 y 0,2 (específicamente, entre 1% y 20%).

El grado de esterificación, que es modulable y reproducible, puede variar, y depende de las características del polisacárido de partida y las condiciones de reacción utilizadas, tales como las proporciones estequiométricas entre el sustrato de polisacárido, el tipo de base catalítica utilizada y el anhídrido butírico.

15 Cualquier función carboxilo no esterificada puede estar presente en forma ácida o salificada con metales alcalinos, especialmente sodio.

El peso molecular de los polisacáridos ácidos está generalmente entre 10^3 y 10^7 daltons; si el polisacárido es ácido hialurónico, el peso molecular está preferiblemente entre 10^4 y 10^6 daltons.

20 En el caso del ácido hialurónico, el grado de esterificación del ácido butírico en los grupos hidroxilo del polímero está preferiblemente entre 0,01 y 0,8, mientras que el grado de esterificación del ácido fórmico en los grupos hidroxilo del polímero está entre 0,01 y 0,20.

25 Variando el grado de esterificación de los componentes individuales, las características químico-físicas y reológicas de los derivados de acuerdo con la invención varían, y se pueden usar en composiciones tópicas para el tratamiento como hidratantes, generadora de elasticidad, tonificantes de la piel, agentes antienvjecimiento o anti-acné o como adyuvantes para el tratamiento de lesiones cutáneas, tales como inflamaciones, úlceras, heridas, dermatitis e hipertermia cutánea causada por irradiación.

La invención también se relaciona con el procedimiento de preparación de dichos derivados.

Dicho procedimiento implica:

30 a) disolver el polisacárido ácido, salificado con sodio u otros metales alcalinos, en formamida mediante calentamiento, a temperaturas entre 60 °C y 120 °C, y preferiblemente 95 °C;

b) añadir a la solución resultante, a temperatura ambiente, una base orgánica, seguido, después de 15 minutos, de anhídrido butírico;

c) diluir la mezcla de reacción viscosa y homogénea con una solución acuosa de NaCl y neutralizarla a un pH de 6-7,5;

35 d) purificar la mezcla de reacción diluida por diálisis o filtración tangencial;

e) congelar la solución de polisacárido purificado y recuperar el producto por liofilización o secado por aspersión.

La base orgánica es una base aromática o alifática que incluye al menos un átomo de nitrógeno trisustituido, preferiblemente dimetilaminopiridina o trietilamina.

40 Una de las ventajas de los compuestos de acuerdo con la invención en comparación, por ejemplo, con el ácido hialurónico comercial nativo (no modificado) es que la presencia de los sustituyentes éster butírico y fórmico del polímero modificado protegen contra la degradación enzimática por las hialuronidasas presentes en los tejidos. Dicha novedosa propiedad de los compuestos de acuerdo con la invención se ilustra mediante el siguiente experimento.

La sal de sodio comercial de HA y las muestras obtenidas como se describe en los ejemplos 2 y 4 se usan en el experimento.

45 La solución madre de polisacárido (10 mg/ml) se deja bajo agitación mecánica suave durante una hora a 37 °C antes de la adición de la enzima. Comenzando con dicha solución, se preparan 10 ml de una solución diluida (1 mg/ml) que contiene 0,1 mg/ml de la enzima (hialuronidasa testicular bovina 1.060 U/mg). Se prepara una segunda solución diluida con una dosis de enzima diez veces menor. Ambas soluciones se dejan incubar a 37 °C. Se toman muestras de 0,6 ml a intervalos regulares y se colocan en un baño de agua a 100 °C durante 5 minutos, se filtran para eliminar la enzima y luego se congelan.

50

Determinación de la distribución del peso molecular medio ponderado por cromatografía HP-SEC-TDA

Las muestras se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño usando una combinación de cuatro detectores (dispersión de la luz a 90° y 8°, índice de refracción y viscosímetro). El procesamiento del cromatograma permite determinar la distribución de los pesos moleculares **M_w** (peso molecular ponderal).

5 Condiciones de Cromatografía

Instrumentación: bomba Viscotek, modelo VE1121; desgasificador en línea de dos canales, Gastorr 150.

Columnas: 2 columnas de lecho mixto GMPWXL, ID de 7,8 mm x 30 cm, Viscotek; temperatura 40 °C.

Fase móvil: 0,1 M NaNO₃.

Rata de flujo: 0,6 ml/min.

10 Detector: mod. Viscotek 302 TDA equipado con índice de refracción, viscosímetro capilar y dispersión de la luz con medición a 90° y 8°, y temperatura de 40 °C.

Volumen inyectado: 100 µl.

15 Las figuras 1 y 2 muestran los valores de peso molecular **M_w** relativos a las muestras tomadas de las soluciones de polímero incubadas con la enzima en el intervalo de 0-4 horas. Las muestras que contienen ácido hialurónico no sustituido nativo presentan una rata de degradación más rápida que las esterificadas parcialmente con ácido butírico/fórmico de acuerdo con la invención. El grado de despolimerización alcanzado en la meseta también es mayor para el polímero nativo. Ambos efectos están modulados por el grado de sustitución en ésteres de butirato/formiato.

20 Con una proporción de polímero:enzima de 10:1 (figura 1), el compuesto relacionado con el ejemplo 4 con un alto grado de esterificación mantiene una rata de polimerización al final del experimento (4 horas) aproximadamente diez veces mayor que la del polímero nativo. Con una proporción de polímero:enzima de 100:1 (figura 2), los compuestos de acuerdo con la invención no se despolimerizan en absoluto, mientras que el peso molecular de HA nativo se reduce en alrededor de dos tercios.

Evaluación de la eficacia in vivo en voluntarios sanos

25 Los ésteres de polisacáridos ácidos de acuerdo con la invención demostraron una potente actividad generadora de elasticidad en experimentos realizados in vivo en voluntarios sanos.

Un ejemplo que ilustra la invención se expone a continuación.

Se preparó un gel que contenía 0,1% de éster de butirato/formiato mezclado de sal de sodio de HA obtenido como se describe en el ejemplo 2, en agua desionizada (98,35%), junto con excipientes, específicamente, un espesante (0,5%) y conservantes (1,05%).

30 Se utilizó un gel con la misma composición, que contiene sal de sodio de HA comercial a la misma concentración (0,1%) y con los mismos excipientes, como comparador.

El objetivo del experimento fue evaluar la eficacia de una formulación de gel que contiene un compuesto de acuerdo con la invención (grupo de tratamiento A), en comparación con sal de sodio comercial de HA no modificada (grupo de tratamiento B), con mediciones instrumentales de humectación y elasticidad.

35 24 voluntarios (edad promedio 49,8 años) aplicaron cada producto a la mitad de la cara dos veces al día, todos los días, durante cuatro semanas.

Al inicio del período de prueba (**T₀**) y al final del tratamiento de cuatro semanas (**T_f**), se realizaron mediciones instrumentales de la hidratación y elasticidad de la piel en el área periocular en los sitios de aplicación. Los voluntarios eliminaron completamente el producto lavándolo con agua tres horas antes de las grabaciones instrumentales.

40 El nivel de hidratación del estrato córneo de la cara se midió con un corneómetro, un instrumento que mide el nivel de hidratación de la superficie de la piel, mientras que la elasticidad de la piel se midió mediante el procedimiento de succión elastométrica usando un cutómetro, un instrumento que mide la deformación de la superficie de la piel cuando es succionada en una sonda de medición. Se creó una presión negativa constante de 350 mbars por un segundo dentro de la sonda en contacto con la piel. El experimento consistió en tres ciclos de succión/liberación que midieron la deformación de las características elásticas de la piel, indicada como parámetro **R₂**.

45 Los resultados así obtenidos se resumen en la tabla a continuación:

Determinación de la elasticidad biológica (parámetro **R₂**)

	To	Tf	Variación	% de Variación	Prueba-t (To-Tf)
Grupo A	0,460	0574	0,114	24,8	P<0,001
Grupo B	0,511	0,523	0,012	2,3	p>0,05

Los datos mostrados en la tabla indican que para la preparación obtenida de acuerdo con la invención (Grupo A) hubo un aumento altamente significativo en el parámetro R2 (elasticidad biológica), mientras que el producto de comparación (Grupo B) no presentó ningún efecto significativo en el parámetro R2.

- 5 Con respecto al parámetro de hidratación, no hubo diferencias significativas entre los tiempos To y Tf para cualquiera de los grupos de tratamiento; este resultado se explica por el tipo de protocolo experimental utilizado, que programó el lavado de la preparación tres horas antes de las mediciones instrumentales.

Evaluación de acción calmante sobre la piel sometida a estrés por calor por radiación

- 10 Ocho pacientes con cáncer de mama, con una edad media de 52 años, fueron tratados con radioterapia con un acelerador lineal de partículas gamma.

El ciclo de tratamiento comprendió 15 tratamientos, que implican la administración de fracciones de 2 Gy, cinco días a la semana, con una dosis total administrada de 30 Gy.

El objetivo del estudio fue evaluar la posibilidad de realizar todos los ciclos de tratamiento requeridos, la tolerabilidad del producto y su eficacia protectora.

- 15 El ungüento obtenido como se describe en el ejemplo 9 se aplicó a la zona irradiada todos los días, tres veces al día, a intervalos de 8 horas entre aplicaciones, comenzando siempre 2 horas antes del tratamiento de radioterapia y continuando durante 5 días después de la finalización de la radioterapia. El área de la piel irradiada se evaluó en esta etapa.

- 20 Todos los pacientes toleraron el ciclo de tratamiento planificado (30 Gy), lo que demuestra el excelente efecto protector y la tolerabilidad de la preparación utilizada.

La eficacia del tratamiento también se evaluó mediante la puntuación de las reacciones adversas en la piel irradiada. Específicamente, se asignaron los siguientes puntajes:

0: sin reacción

1: eritema leve

- 25 2: eritema moderado

3: eritema severo

4: descamación.

Un paciente de los 8 presentó descamación, 1 eritema moderado, 1 eritema leve y 5 sin reacción.

- 30 En conclusión, este ensayo preliminar con una preparación de crema de acuerdo con la invención demostró una buena tolerabilidad y un excelente efecto protector local contra la dermatitis inducida por radioterapia.

Estos hallazgos indican claramente que los derivados de acuerdo con la invención se pueden usar ventajosamente como ingredientes activos de composiciones tópicas mezcladas con vehículos inertes dermatológicamente aceptables.

- 35 Los derivados de acuerdo con la invención podrían estar presentes en porcentajes que oscilan entre el 0,05% y el 5% en peso. Las composiciones adecuadas incluyen cremas, ungüentos, geles, líquidos hidrófilos, lociones acuosas o hidroalcohólicas, emulsiones de aceite/agua o agua/aceite.

La preparación de ésteres butíricos/fórmicos mezclados de polisacáridos ácidos se reporta en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Síntesis de éster butírico y fórmico de la sal de sodio del ácido hialurónico (BUT07005)

- 40 5,00 g de hialuronato de sodio con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa se solubilizan en 100 ml de formamida a 95 °C, bajo flujo de nitrógeno y con agitación mecánica durante aproximadamente 1 hora.

La solución de polisacárido resultante se deja enfriar a temperatura ambiente, y se dejan caer 503,3 mg de una solución de 4-dimetilaminopiridina en 5 ml de formamida, a una rata de 1,67 ml/min. Después de 15 minutos, se

añaden 734 μ l de anhídrido butírico y se deja reaccionar durante 40 minutos. La mezcla de reacción, que es homogénea y altamente viscosa, se transfiere a 1,2 L de NaCl al 0,9% (p/v).

La solución se filtra bajo presión reducida a través de un filtro de vidrio sinterizado, y luego se diluye adicionalmente con una solución de NaCl al 0,9% (p/v) hasta el volumen final de 2,5 L.

- 5 El producto se purifica por filtración tangencial a través de una membrana de filtro con una porosidad de 10 kDa, primero contra NaCl al 0,9% (p/v), y luego exhaustivamente contra agua ultrapura.

Finalmente, la solución se congela y el producto se recupera por liofilización; se obtienen 4,03 g de liofilizado blanco.

El liofilizado se analiza por ^1H RMN.

Grado de sustitución del éster butírico (DS but.): 0,13, grado de sustitución del éster fórmico (DSform.): 0,07.

10 **Ejemplo 2: Síntesis de éster butírico y fórmico de sal de sodio del ácido hialurónico (BUT07002)**

5,00 g de hialuronato de sodio con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa se solubilizan en 100 ml de formamida a 95 °C, bajo flujo de nitrógeno y con agitación mecánica, durante aproximadamente 1 hora.

- 15 La solución de polisacárido resultante se deja enfriar a temperatura ambiente, y se deja caer una solución de 0,76 g de 4-dimetilaminopiridina en 5 ml de formamida, a una velocidad de 1,67 ml/min. Después de 15 minutos, se agrega 1,0 ml de anhídrido butírico y se deja reaccionar durante 40 minutos. La mezcla de reacción, que es homogénea y muy viscosa, se transfiere a 1,2 L de NaCl al 0,9% (p/v).

La solución se filtra bajo presión reducida a través de un filtro de vidrio sinterizado, y luego se diluye adicionalmente con una solución de NaCl al 0,9% (p/v) hasta el volumen final de 2,5 L.

- 20 La muestra se purifica por filtración tangencial a través de una membrana de filtro con una porosidad de 10 kDa, primero contra NaCl al 0,9% (p/v), y luego exhaustivamente contra agua ultrapura.

La solución de polisacárido finalmente se congela, y el producto se recupera por liofilización; se obtienen 4,90 g de liofilizado blanco.

El liofilizado se analiza por ^1H RMN.

Grado de sustitución del éster butírico (DS but.): 0,23, grado de sustitución del éster fórmico (DSform.): 0,07.

25 **Ejemplo 3: Síntesis de éster butírico y fórmico de sal de sodio del ácido hialurónico (BUT07004)**

5,00 g de hialuronato de sodio con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa se solubilizan en 100 ml de formamida a 95 °C, bajo flujo de nitrógeno y con agitación mecánica, durante aproximadamente 1 hora.

- 30 La solución de polisacárido resultante se deja enfriar a temperatura ambiente, y se deja caer una solución de 1,26 g de 4-dimetilaminopiridina en 8 ml de formamida, a una rata de 1,67 ml/min. Después de 15 minutos, se añaden 1,7 ml de anhídrido butírico y se deja reaccionar durante 40 minutos. La mezcla de reacción, que es homogénea y altamente viscosa, se transfiere a 1,2 L de NaCl al 0,9% (p/v).

La solución se filtra bajo presión reducida a través de un filtro de vidrio sinterizado, y luego se diluye adicionalmente con una solución de NaCl al 0,9% (p/v) hasta el volumen final de 2,5 L.

- 35 La muestra se purifica por filtración tangencial a través de una membrana de filtro con una porosidad de 10 kDa, primero contra NaCl al 0,9% (p/v), y luego exhaustivamente contra agua ultrapura.

La solución de polisacárido finalmente se congela, y el producto se recupera por liofilización; se obtienen 4,79 g de liofilizado blanco.

El liofilizado se analiza por ^1H RMN.

Grado de sustitución del éster butírico (DS but.): 0,50, grado de sustitución del éster fórmico (DSform.): 0,06.

40 **Ejemplo 4: Síntesis de éster butírico y fórmico de sal de sodio del ácido hialurónico (BUT07001)**

5,00 g de hialuronato de sodio con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa se solubilizan en 100 ml de formamida a 95 °C, bajo flujo de nitrógeno y con agitación mecánica, durante aproximadamente 1 hora.

- 45 La solución de polisacárido resultante se deja enfriar a temperatura ambiente, y se deja caer una solución de 1,67 g de 4-dimetilaminopiridina en 10 ml de formamida, a una rata de 1,67 ml/min. Después de 15 minutos, se añaden 2,25 ml de anhídrido butírico y se deja reaccionar durante 40 minutos. La mezcla de reacción, que es homogénea y altamente viscosa, se transfiere a 1,2 L de NaCl al 0,9% (p/v).

La solución se filtra bajo presión reducida a través de un filtro de vidrio sinterizado, y luego se diluye adicionalmente con una solución de NaCl al 0,9% (p/v) hasta el volumen final de 2,5 L.

La muestra se purifica por filtración tangencial a través de una membrana de filtro con una porosidad de 10 kDa, primero contra NaCl al 0,9% (p/v), y luego exhaustivamente contra agua desmineralizada.

- 5 La solución de polisacárido finalmente se congela, y el producto se recupera por liofilización; se obtienen 5,15 g de liofilizado blanco.

El liofilizado se analiza por ¹H RMN.

Grado de sustitución del éster butírico (DS but.): 0,69, grado de sustitución del éster fórmico (DSform.): 0,04.

Ejemplo 5: Síntesis de éster butírico y fórmico de la sal de sodio del ácido hialurónico (BUT07007)

- 10 23,00 g de hialuronato de sodio con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa se solubilizan en 0,46 L de formamida a 95 °C, bajo flujo de nitrógeno y con agitación mecánica, durante aproximadamente 1 hora.

La solución de polisacárido resultante se deja enfriar a temperatura ambiente, y se deja caer una solución de 5,47 g de 4-dimetilaminopiridina en 20 ml de formamida, a una rata de 2,0 ml/min. Después de 15 minutos, se añaden 7,3 ml de anhídrido butírico y se deja reaccionar durante 40 minutos. La mezcla de reacción, que es homogénea y altamente viscosa, se transfiere a 2,5 L de NaCl al 0,9% (p/v).

- 15

La solución se filtra bajo presión reducida a través de un filtro de vidrio sinterizado, y luego se diluye adicionalmente con una solución de NaCl al 0,9% (p/v) hasta el volumen final de 8,0 L.

La muestra se purifica por filtración tangencial a través de una membrana de filtro con una porosidad de 10 kDa, primero contra NaCl al 0,9% (p/v), y luego exhaustivamente contra agua ultrapura.

- 20 La solución de polisacárido finalmente se congela, y el producto se recupera por liofilización; se obtienen 22,26 g de liofilizado blanco.

El liofilizado se analiza por ¹H RMN.

Grado de sustitución del éster butírico (DS but.): 0,41, grado de sustitución del éster fórmico (DSform.): 0,07.

Ejemplo 6: Síntesis de éster butírico y fórmico de la sal de sodio del ácido hialurónico (BUT07008)

- 25 23,00 g de hialuronato de sodio con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa se solubiliza en 0,46 L de formamida a 95 °C, bajo flujo de nitrógeno y con agitación mecánica, durante aproximadamente 1 hora.

La solución de polisacárido resultante se deja enfriar a temperatura ambiente, y se deja caer una solución de 7,71 g de 4-dimetilaminopiridina en 35 ml de formamida, a una rata de 3,5 ml/min. Después de 15 minutos, se añaden 10,3 ml de anhídrido butírico y se deja reaccionar durante 40 minutos. La mezcla de reacción, que es homogénea y altamente viscosa, se transfiere a 7,0 L de NaCl al 0,9% (p/v).

- 30

La solución se filtra bajo presión reducida a través de un filtro de vidrio sinterizado, y luego se diluye adicionalmente con una solución de NaCl al 0,9% (p/v) hasta el volumen final de 8,0 L.

La muestra se purifica mediante filtración tangencial a través de una membrana de filtro con una porosidad de 10 kDa, primero contra 0,9% de NaCl (p/v), y luego exhaustivamente contra agua ultrapura.

- 35 La solución de polisacárido finalmente se congela, y el producto se recupera por liofilización; se obtienen 23,50 g de liofilizado blanco.

El liofilizado se analiza por ¹H RMN.

Grado de sustitución del éster butírico (DS but.): 0,54, grado de sustitución del éster fórmico (DSform.): 0,10.

Ejemplo 7: Síntesis de sal de sodio de éster butírico y fórmico de ácido hialurónico (BUT07014)

- 40 150,00 g de hialuronato de sodio con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa se solubilizan en 3 L de formamida a 95 °C, bajo flujo de nitrógeno y con agitación mecánica, durante 1 hora y 45 minutos.

La solución de polisacárido resultante se deja enfriar a temperatura ambiente, y se deja caer una solución de 32,00 g de 4-dimetilaminopiridina en 200 ml de formamida, a una velocidad de 20,0 ml/min. Después de 15 minutos, se añaden 43,0 ml de anhídrido butírico y se deja reaccionar durante 45 minutos. La mezcla de reacción, que es homogénea y altamente viscosa, se transfiere a 4,0 L de agua ultrapura.

- 45

La solución se filtra bajo presión reducida a través de un filtro de vidrio sinterizado, y luego se diluye con agua ultrapura hasta el volumen final de 30,0L.

La muestra se purifica entonces por filtración tangencial a través de una membrana de filtro con una porosidad de 10 kDa, primero contra NaCl al 0,9% (p/v), y luego exhaustivamente contra agua ultrapura.

- 5 La solución se esteriliza haciéndola pasar a presión (2 bar) a través de una membrana de filtro de 0,22 μm , y finalmente se congela.

El producto se recupera por liofilización, para obtener 140 g de liofilizado blanco.

El liofilizado se analiza por ^1H RMN.

Grado de sustitución del éster butírico (DS but.): 0,32, grado de sustitución del éster fórmico (DSform.): 0,07.

10 **Ejemplo 8: Síntesis de éster butírico y fórmico de la sal de sodio del sulfato de condroitina (BUT07015)**

201,9 mg de sulfato de condroitina con un peso molecular de aproximadamente 20 kDa se solubilizan en 1 ml de formamida a 95 °C, bajo flujo de nitrógeno y con agitación mecánica, durante aproximadamente 20 minutos.

- 15 La solución de polisacárido resultante se deja enfriar a temperatura ambiente, y se agrega una solución de 49,2 mg de 4-dimetilaminopiridina en 0,5 ml de formamida. Se agregan 65 μl de anhídrido butírico después de 15 minutos y se deja para reaccionar durante 40 minutos.

El producto se recupera mediante precipitación en 20 volúmenes de acetona, se lava 3 veces con acetona y luego se seca a baja presión.

Se obtienen 180,0 mg de un sólido blanco. La muestra se analiza por ^1H RMN.

Grado de sustitución del éster butírico (DS but.): 0,50, grado de sustitución del éster fórmico (DS form.): 0,03.

20 **Ejemplo 9: Preparación de una crema generadora de elasticidad de Aceite/Agua**

Un ejemplo no limitativo de la invención, que ilustra la preparación de una formulación en crema que contiene uno de los ésteres butírico/fórmico de acuerdo con la invención, se expone a continuación.

- 25 La formulación de crema de Aceite/Agua contiene el compuesto descrito en el ejemplo 2 como agente generador de elasticidad y humectante, a la concentración de 0,1%, adecuadamente mezclado con excipientes comunes usados en cosméticos dermatológicos, tales como emulsificantes, espesantes, aceites, humectantes, agentes gelificantes, conservantes, etc.

En resumen, el procedimiento es el siguiente:

- 30 Aproximadamente 600 ml de agua desmineralizada (correspondiente a aproximadamente 60% en peso de la formulación total) se cargan en un turboemulsificador, y la fase grasa previamente fundida se agrega bajo agitación a aproximadamente 70 °C. La mezcla se emulsiona y se enfría lentamente a la temperatura de 35-40 °C. Los componentes termolábiles y volátiles se añaden a esta temperatura, seguido del éster butírico/fórmico de la sal de sodio de HA descrito en el ejemplo 2, disuelto en una cantidad adecuada de agua. La mezcla se deja bajo agitación lenta hasta que se alcanza la temperatura de 25-30 °C, y el producto terminado se descarga entonces en un contenedor adecuado.

- 35 El resultado es una crema con la siguiente composición (% P/P):

Éster butírico/fórmico de sodio de HA (Ejemplo 2)	0,1
Aceites (palmítico/caprílico glicéridos-triglicéridos)	12
Emulsificantes no-iónicos	6
Alcohol cetílico	2
Dimeticona	4
Silicato de MgAl	2
Glicerina	3

ES 2 660 847 T3

(continuación)

Xilitol	2
Parabenos	0,7
H ₂ O q.s. a 100	

REIVINDICACIONES

1. Polisacáridos ácidos seleccionados de ácido hialurónico, sulfato de condroitina, dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato, **caracterizados por** la presencia concomitante de grupos alcohol esterificados con ácidos butíricos y fórmicos, obteniéndose dichos polisacáridos ácidos mediante un procedimiento que comprende:
- 5 a) disolver el polisacárido ácido, salificado con sodio u otros metales alcalinos, en formamida por calentamiento;
- b) añadir a la solución resultante, a temperatura ambiente, una base orgánica, seguido, después de 15 minutos, de anhídrido butírico;
- c) diluir la mezcla de reacción viscosa y homogénea con una solución acuosa de NaCl y neutralizarla a un pH de 6-7,5;
- 10 d) purificar la mezcla de reacción diluida por diálisis o filtración tangencial;
- e) congelar la solución de polisacárido purificado y recuperar el producto por liofilización o secado por aspersión.
2. Polisacáridos ácidos según la reivindicación 1, en los que el grupo carboxilo está presente en forma ácida o salificado con metales alcalinos, en particular sodio.
3. Polisacáridos ácidos según la reivindicación 1, en los que el peso molecular se selecciona del intervalo de 10^3 a 10^7 daltons.
- 15 4. Polisacáridos ácidos según la reivindicación 1, en los que el polisacárido es ácido hialurónico con un peso molecular de entre 10^4 y 10^6 daltons.
5. Polisacáridos ácidos según la reivindicación 1, **caracterizados porque** el grado de esterificación del ácido butírico en los grupos hidroxilo del polímero está entre 0,01 y $1 \cdot N$, donde N es el número de grupos de alcohol libres presentes en la unidad repetitiva, mientras que el grado de esterificación del ácido fórmico en los grupos hidroxilo del polímero está entre 0,01 y 0,20.
- 20 6. Polisacáridos ácidos según la reivindicación 1, **caracterizados porque** el grado de esterificación del ácido butírico en los grupos hidroxilo del polímero está entre 0,01 y $0,2 \cdot N$, donde N es el número de grupos de alcohol libres presentes en la unidad repetitiva, mientras que el grado de esterificación del ácido fórmico en los grupos hidroxilo del polímero está entre 0,01 y 0,20.
- 25 7. Polisacáridos ácidos según la reivindicación 1, en los que el polisacárido ácido es ácido hialurónico, **caracterizado porque** el grado de esterificación del ácido butírico en los grupos hidroxilo del polímero está entre 0,01 y 0,8, mientras que el grado de esterificación del ácido fórmico en los grupos hidroxilo del polímero está entre 0,01 y 0,20.
8. Procedimiento de preparación de polisacáridos ácidos según las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:
- 30 a) disolver el polisacárido ácido, salificado con sodio u otros metales alcalinos, en formamida por calentamiento;
- b) añadir a la solución resultante, a temperatura ambiente, una base orgánica, seguido, después de 15 minutos, de anhídrido butírico;
- c) diluir la mezcla de reacción viscosa y homogénea con una solución acuosa de NaCl y neutralizarla a un pH de 6-7,5;
- 35 d) purificar la mezcla de reacción diluida por diálisis o filtración tangencial;
- e) congelar la solución de polisacárido purificado y recuperar el producto por liofilización o secado por aspersión.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la base es una base orgánica aromática o alifática que comprende un átomo de nitrógeno trisustituido, preferiblemente dimetilaminopiridina o trietilamina.
10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la temperatura de solubilización del polisacárido en formamida está entre 60 °C y 120 °C, y preferiblemente 95 °C.
- 40 11. Procedimiento de preparación de polisacáridos ácidos según la reivindicación 1 u 8, en el que el éster de formiato procede de la hidrólisis de la formamida en presencia de anhídrido butírico y una base.
12. Composiciones tópicas que contienen los derivados de polisacáridos ácidos según las reivindicaciones 1-7, y vehículos inertes dermatológicamente aceptables.
- 45 13. Composiciones tópicas según la reivindicación 12, **caracterizadas porque** incluyen entre el 0,05% y el 5% de ácido polisacárido en peso de la composición.

- 14.** Composiciones tópicas según la reivindicación 12, seleccionadas entre cremas, ungüentos, geles, líquidos hidrófilos, lociones acuosas o hidroalcohólicas, emulsiones aceite/agua o agua/aceite.
- 15.** Composiciones tópicas según las reivindicaciones 12-14 para uso en el tratamiento como agentes hidratantes, generadores de elasticidad, tonificantes de la piel, antienvjecimiento y antiacné.
- 5 **16.** Composición tópica según las reivindicaciones 12-14 para uso en el tratamiento adyuvante de lesiones cutáneas.
- 17.** Composiciones tópicas para uso según la reivindicación 16, en las que las lesiones cutáneas son inflamaciones, úlceras crónicas, heridas, dermatitis atópica o de contacto, signos de envejecimiento o hipertermia cutánea causada por radiación.

Figura 1

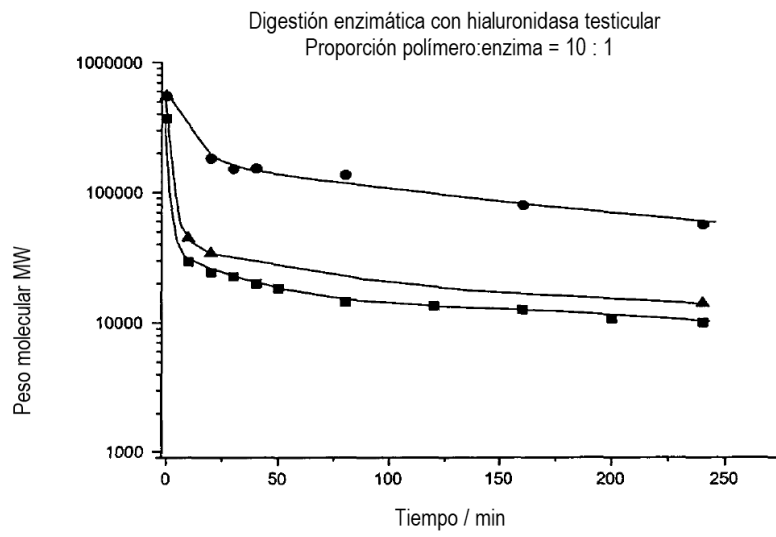
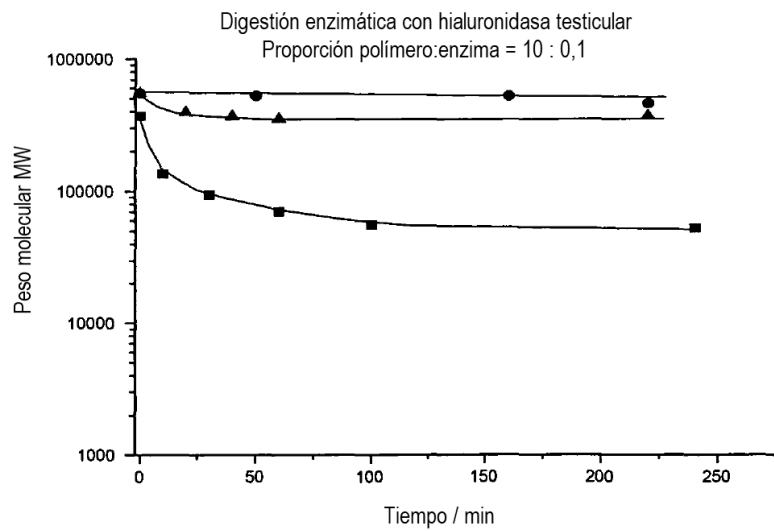


Figura 2



HA: muestra comercial $M_w = 300$ kDa

- : HABF ejemplo 4: D.S. = 0,7 (butírico), 0,04 (fórmico)
- ▲ : HABF ejemplo 2: D.S. = 0,2 (butírico), 0,07 (fórmico)