

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 000**

21 Número de solicitud: 201830311

51 Int. Cl.:

A61K 8/65 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.03.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.10.2019

71 Solicitantes:

INFINITEC ACTIVOS, S.L. (100.0%)
Can Parellada 22, Nave 2-3
08170 Montornés del Vallés (Barcelona) ES

72 Inventor/es:

MOURELLE MANCINI, Marisabel y
ALEA REYES, María Elisa

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Nanopartículas de oro y palmitoíl pentapéptido-4**

57 Resumen:

Oanopartículas de oro y palmitoíl pentapéptido-4.
La presente invención se relaciona con nanopartículas de oro conjugadas con palmitoíl pentapéptido-4 (Palm-L-Lys-L-Thr-L-Thr-L-Lys-L-Ser-OH), composiciones que las comprenden, su uso en tratamientos cosméticos, así como procedimientos de obtención de dichas nanopartículas.

ES 2 726 000 A1

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas de oro y palmitoíl pentapéptido-4

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con nanopartículas de oro conjugadas con palmitoíl pentapéptido-4, composiciones que las comprenden, su uso en tratamientos cosméticos, así como procedimientos de obtención de dichas nanopartículas.

10

Antecedentes de la invención

El primer signo perceptible del envejecimiento de la piel es la formación de finas líneas y de arrugas. Estas finas líneas aparecen en diferentes zonas faciales y son los signos de envejecimiento que se reconocen más fácilmente. Las finas líneas son las primeras en aparecer. Estas arrugas pequeñas y poco profundas tienden a percibirse en los ángulos externos de los ojos. También se conocen como líneas de la risa o patas de gallo. Las finas líneas pueden localizarse también en las mejillas. En la frente, las arrugas se perciben como líneas horizontales, y pueden estar desencadenadas por la expresión facial y tienden a ser más profundas en el transcurso del tiempo. Las líneas verticales, de menor tamaño, entre las cejas están causadas por el fruncido de las mismas.

20

Existen numerosos productos cosméticos en el mercado para para mejorar el aspecto cutáneo frente al envejecimiento, en particular con respecto a las arrugas.

25

La administración por vía tópica de agentes cosméticos o terapéuticos es un reto en el campo de las formulaciones cosméticas o farmacéuticas ya que la piel presenta una baja permeabilidad para moléculas de alto peso molecular.

30 Precisamente, la función principal de la piel es la regulación de la entrada de sustancias en el cuerpo. La piel de los mamíferos consta de dos capas principales: la epidermis y la dermis. La epidermis está formada por el estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal, constituyendo el estrato córneo la superficie de la piel y constituyendo el estrato basal la parte más profunda de la epidermis. El estrato córneo es la capa de la piel que contribuye en mayor grado a las propiedades de barrera y que dificulta el paso de las sustancias cosméticamente activas a capas más profundas.

35

Se han estudiado diversos sistemas para atravesar el estrato córneo y lograr la penetración de agentes cosméticos o terapéuticos en capas más profundas de la piel. Uno de estos sistemas es el uso de nanomateriales tales como las nanopartículas [Baroli, B. *J. Pharm. Sci.*, 2010, 99(1), 21-50]. Entre las nanopartículas que se han propuesto se encuentran las nanopartículas lipídicas, las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas magnéticas, y las nanopartículas metálicas entre las que se encuentran las nanopartículas de oro [Gupta, R. y Rai, B.; *J. Phys. Chem. B*, 2016, 120(29), 7133-7142]. Se ha descrito que dichas nanopartículas son capaces de penetrar en capas profundas de la piel (epidermis y dermis).

10

Se conoce desde hace tiempo la posibilidad de utilizar determinados péptidos cortos como compuestos con actividad antiarrugas. Ejemplos de dichos péptidos son el acetil hexapéptido-3, el palmitoil tetrapéptido-7, el trifluoroacetil-tripéptido-2, el palmitoil tripéptido-1, el palmitoil tripéptido-38, palmitoil hexapéptido-14 y el palmitoil pentapéptido-4. El palmitoil pentapéptido-4 (PP-4) es un péptido de fórmula Palm-L-Lys-L-Thr-L-Thr-L-Lys-L-Ser-OH (Palm-SEQ ID NO: 1). Este péptido también se conoce con el nombre Matrixyl®. Dicho péptido y su actividad antiarrugas se han descrito en WO 00/15188 A1.

15

La presente invención tiene como objetivo proporcionar composiciones mejoradas para el tratamiento de las arrugas.

20

Sumario de la invención

Los inventores han descubierto que conjugando el péptido PP-4 (péptido de fórmula (I)) con nanopartículas de oro se logra una penetración de dicho péptido en capas profundas de la piel. Sorprendentemente, dicha penetración es mucho mayor que la del péptido de fórmula (I) en una composición de dicho péptido y nanopartículas de oro sin conjugar, tal como se muestra en los ejemplos. Además, la conjugación del péptido de fórmula (I) con nanopartículas de oro proporciona una estabilidad inesperada al péptido de fórmula (I), en particular frente a la degradación enzimática por proteasas. Sorprendentemente, estos efectos no se obtienen al conjugar otros péptidos con nanopartículas de oro, tal como se muestra en los ejemplos. Por ello, el experto en la materia no encuentra en el estado de la técnica ninguna guía que le permita saber qué péptidos concretos pueden conjugarse con qué nanopartículas con el objetivo de obtener formulaciones de dichos péptidos con estabilidad mejorada y buena penetración.

35

Por ello, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con nanopartículas de oro conjugadas con un péptido de fórmula (I):



(I)

5 en el que R es un resto acilo C₁₀-C₂₂, preferiblemente un resto palmitoílo.

En un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con una composición que comprende las nanopartículas definidas en el primer aspecto y agua.

10 En un tercer aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de nanopartículas según se definen en el primer aspecto en la preparación de una composición según se define en el segundo aspecto.

En un cuarto aspecto, la presente invención se relaciona con el uso (cosmético) de
15 nanopartículas según se definen en el primer aspecto o de una composición según se define en el segundo aspecto para el cuidado de la piel.

En un quinto aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de nanopartículas según se definen en el primer aspecto, que comprende:

20 (a) reducción de Au(III) de un compuesto que contiene dicho Au(III) a Au(0) mediante tratamiento con un agente reductor para formar nanopartículas de oro y
(b) tratamiento de las nanopartículas de oro obtenidas en la etapa (a) con el péptido de fórmula (I).

25 **Descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra el porcentaje de penetración cutánea de las diferentes composiciones ensayadas tras 20 horas de incubación.

30 **Descripción detallada de la invención**

Nanopartículas de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con nanopartículas de oro
35 conjugadas con un péptido de fórmula (I):



(I).

en el que R es un resto acilo C₁₀-C₂₂, preferiblemente un resto palmitoílo.

Las nanopartículas de la presente invención presentan un núcleo de oro recubierto del péptido de fórmula (I). En el contexto de la presente invención, los términos “conjugado(s)” y “conjugada(s)” hacen referencia a que las nanopartículas de oro están unidas al péptido de fórmula (I) mediante enlace iónico de tipo electrostático establecido entre las cargas negativas de la superficie de oro de las nanopartículas y las cargas positivas del aminoácido Lys (lisina) presente en el péptido de fórmula (I). La carga positiva aportada por este aminoácido al péptido es la responsable de la unión establecida entre el péptido de fórmula (I) y la superficie de oro de las nanopartículas llevando a cabo la funcionalización de las mismas donde el péptido recubrirá la superficie externa de las nanopartículas de oro garantizando la formación y estabilidad de las mismas.

En el contexto de la presente invención, el término “nanopartícula” hace referencia a partículas cuyo diámetro medio es inferior a 1000 nm, preferiblemente inferior a 500 nm, más preferiblemente inferior a 250 nm, más preferiblemente inferior a 200 nm, preferiblemente entre 1 y 1000 nm, más preferiblemente entre 1 y 500 nm, más preferiblemente entre 1 y 250 nm, más preferiblemente entre 1 y 200 nm, más preferiblemente entre 50 y 200 nm, más preferiblemente entre 100 y 200 nm, aún más preferiblemente entre 150 y 200 nm.

El tamaño de las nanopartículas puede determinarse mediante procedimientos convencionales en la técnica, en particular mediante dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*). Primero se preparan las muestras a determinar el tamaño de partícula. Para ello se pesa 1 mg si es polvo y se suspende en 1 mL de H₂O milliQ. En el caso de muestras líquidas se toma con pipeta automática una alícuota de 100 µL de la muestra a la cual se le añade 900 µL de H₂O milliQ. Posteriormente se procede a la medida del tamaño de partícula utilizando cubetas de cuarzo y como equipo el Zetasizer Nano ZS serie (Malvern Instruments) del Instituto de Química Avanzada de Cataluña, CSIC. Las medidas del tamaño de partícula se pueden realizar por triplicado con el objetivo de demostrar la reproducibilidad de las mismas.

En una realización preferida, el potencial zeta de las nanopartículas de la invención está comprendido entre -5 mV y -60 mV, preferiblemente entre -10 mV y -50 mV, más preferiblemente entre -20 mV y -40 mV, aún más preferiblemente entre -30 mV y -40 mV.

El término “potencial zeta” o ζ hace referencia a una medida de la carga superficial de las nanopartículas. El potencial zeta determina el grado de repulsión entre nanopartículas adyacentes de carga del mismo signo. Si baja más de un valor determinado, las fuerzas de atracción exceden a las de repulsión y las nanopartículas se agregan.

El potencial zeta de las nanopartículas puede determinarse mediante procedimientos convencionales en la técnica, en particular mediante el método descrito a continuación.

10 La preparación de las muestras a determinar el potencial Z consiste en pesar 1 mg si es polvo y se suspende en 1 mL de H₂O milliQ. Mientras que en el caso de muestras líquidas se toma con pipeta automática una alícuota de 100 μ L de la muestra a la cual se le añade 900 μ L de H₂O milliQ. Posteriormente se procede a la medida del potencial Z utilizando cubetas DTS1070 de plástico y como equipo el Zetasizer Nano ZS serie (Malvern Instruments) del Instituto de Química Avanzada de Cataluña, CSIC. Las medidas del potencial Z pueden realizarse por triplicado con el objetivo de demostrar la reproducibilidad de las mismas.

En una realización particular, las nanopartículas de la invención presentan una concentración de péptido de fórmula (I) de 0,01 a 1 mg por cada mg de nanopartículas, preferiblemente de 0,01 a 0,5 mg/mg, más preferiblemente de 0,05 a 0,5 mg/mg, más preferiblemente de 0,1 a 0,5 mg/mg, aún más preferiblemente de 0,1 a 0,3 mg/mg.

Composiciones de la invención

25

En un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con una composición que comprende las nanopartículas definidas en el primer aspecto inventivo y agua.

En una realización particular, dicha composición es una dispersión de las nanopartículas en agua, es decir, un coloide. En el contexto de la presente invención un colide hace referencia a un sistema formado por dos o más fases, una fluida (líquido) y otra dispersa en forma de partículas cuyo tamaño está comprendido entre 1 y 1000 nm y, por tanto, las partículas no son visibles a nivel macroscópico pero sí lo son a nivel microscópico.

35 En una realización particular, la dispersión de las nanopartículas en agua, es decir, el coloide, presenta una concentración de péptido de fórmula (I) de 0,01 a 1 mg por cada ml de

dispersión, preferiblemente de 0,01 a 0,5 mg/ml, más preferiblemente de 0,05 a 0,5 mg/ml, más preferiblemente de 0,1 a 0,5 mg/ml, aún más preferiblemente de 0,1 a 0,3 mg/ml.

5 En una realización preferida, la composición contiene al menos 90% de agua con respecto a la suma del peso de agua y nanopartículas en la composición, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 99%, lo más preferido al menos 99,5%.

10 En otra realización preferida, las composiciones de la invención pueden comprender además un agente cosmético seleccionado del grupo que consiste en tensioactivos, agentes hidratantes, antioxidantes, emolientes, conservantes, humectantes, modificadores de la viscosidad y mezcla de los mismos.

15 En el contexto de la presente invención, un “tensioactivo” es una sustancia que disminuye la tensión superficial de una composición respecto a la misma composición en ausencia de dicho componente y además facilita la distribución uniforme de la composición cuando ésta se utiliza. Ejemplos de tensioactivos adecuados para las composiciones de la invención son bromuro de lauril isoquinolinio e alcohol isopropílico, polisorbato 20, sterareth-2 (éter de polietilenglicol (2 unidades) y alcohol estearílico), oleth-2 (éter de polietilenglicol (2 unidades) y alcohol oleílico), glicéridos de caprílico/cáprico PEG-8 (etoxilado con 8 unidades de polietilenglicol, cocoanfoacetato de sodio, ésteres de aceite de coco - poliglicerol 6, ésteres de aceite de almendra – PEG-8, cocosulfato de amonio y ésteres de aceite de aguacate- PEG-11, y mezcla de los mismos.

25 En el contexto de la presente invención, un “agente hidratante” hace referencia a una sustancia que aumenta el contenido en agua de la piel o el cabello y ayuda a mantenerla suave. Ejemplos de agentes hidratantes adecuados para las composiciones de la invención son aceite de semilla de *vitis vinifera*, ceramida, glicosilceramida, ésteres de aceite de uva – PEG-8, ésteres de glicerilo – manteca de cacao, ésteres cetílicos de manteca de karité, glicérido de manteca de karité, cocoato de laurilo y mezclas de los mismos.

30 En el contexto de la presente invención, un “antioxidante” hace referencia a una sustancia que inhibe o reduce las reacciones promovidas por el oxígeno, evitando así la oxidación y rancidez. Ejemplos de antioxidantes adecuados para las composiciones de la invención son tocoferol, fosfato de tocoferilo sódico, ascorbato de 3-glicerilo, acetilcisteína, extracto de callo de *aloe vera*, ácido ascórbico, dipalmitato de ascorbilo, polipéptido de ácido ascórbico,

35

trihexilcitrato de acetilo, linoleato de ascorbilo, 2-acetilhidroquinona, apo-lactoferrina, glucósido de ascorbilo, lactósido de ascorbilo, y mezclas de los mismos.

5 En el contexto de la presente invención, un “emoliente” hace referencia a una sustancia que suaviza la piel. Ejemplos de antioxidantes adecuados para las composiciones de la invención son apo-lactoferrina, cera de flor de *acacia dealbata*, acetilarginina, acetilprolina, acetilhidroxiprolina, estearato de glicol acetilado, extracto de algas, ésteres de aceite de almendra y propilenglicol, fosfato de aminopropiltocoferilo, 1,2,6-hexanotriol, y mezclas de los mismos.

10

En el contexto de la presente invención, un “conservante” se refiere a una sustancia que inhibe el desarrollo de microorganismos en la composición. Ejemplos de conservantes adecuados para las composiciones de la invención son fenoxietanol; una mezcla de caprilil glicol, caprilato de glicerilo, glicerina y fenilpropanol; una mezcla de alcohol bencílico, 15 caprilato de glicerilo y undecilenato de glicerilo; una mezcla de 2,2-hexanodiol y caprililglicol; una mezcla de alcohol fenético y etilhexilglicerina; una mezcla de pentileno glicol, caprilil glicol y etilhexilglicerina.

20 En el contexto de la presente invención, un “humectante” se refiere a una sustancia que retiene la humedad. Ejemplos de humectantes adecuados para las composiciones de la invención son ascorbato de 3-glicerilo, acetilciclodextrina, propanodiol, extracto de algas, 2,3-butanodiol, ascorbato de 3-etilhexilglicerilo, ascorbato de 3-laurilglicerilo y ascorbato de capril 3-glicerilo.

25 En el contexto de la presente invención, un “modificador de la viscosidad” hace referencia a una sustancia aumenta la viscosidad de una composición, preferiblemente de una composición acuosa. Ejemplos de modificadores de la viscosidad adecuados para las composiciones de la invención son carbómero, carbómero de sodio, sulfato de dextrano sódico, carboximetilquitosano, propanodiol, carboximeildextrano, steareth-30, steareth-40, 30 steareth-50, polinaftalenosulfonato de sodio, croscarmelosa, glicereth-polifosfato sódico, y mezclas de los mismos.

35

En otra realización preferida, las composiciones de la invención están en forma de una crema, un suero, una emulsión, un gel, una espuma, una pasta, un ungüento, una leche o una solución, preferiblemente en forma de crema, solución, suero o gel.

- 5 En un tercer aspecto, las nanopartículas de la presente invención se usan en la preparación de una composición según la presente invención.

Dichas composiciones se pueden preparar mediante mezcla de las nanopartículas de la invención con el resto de componentes de las composiciones correspondientes.

10

Usos cosméticos de las nanopartículas y composiciones de la invención

- Tal como se ha explicado en la descripción de los antecedentes de la presente invención, el palmitoíl pentapéptido-4 (PP-4, péptido de fórmula (I)) presenta actividad antiarrugas [WO
15 00/15188 A1].

Por ello, en otro aspecto la presente invención se relaciona con el uso de las nanopartículas o composiciones de la invención en el cuidado de la piel. Dicho uso es cosmético.

- 20 En el contexto de la presente invención, el término "cuidado" hace referencia al mantenimiento o mejora de las cualidades de la piel, tales como, arrugas, elasticidad, firmeza, hidratación, brillo, tono, o textura, entre otros, preferiblemente arrugas.

- En una realización preferida, el cuidado de la piel es el tratamiento cosmético de arrugas y/o
25 prevención cosmética de la aparición de arrugas.

- En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" hace referencia a un tratamiento cosmético, no terapéutico, en donde la aplicación de la composición de la invención en la piel y mejorar el aspecto cosmético de la piel en cuanto a las arrugas, ya sea
30 disminuyendo la profundidad de las arrugas, disminuyendo el número de arrugas o ambas.

En el contexto de la presente invención, el término "prevención" hace referencia a la capacidad de la composición de la invención de prevenir, retrasar, o impedir la aparición de arrugas en la piel.

35

Procedimiento de obtención de las nanopartículas de la invención

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de nanopartículas de la invención, que comprende:

- 5 (a) reducción de Au(III) de un compuesto que contiene dicho Au(III) a Au(0) mediante tratamiento con un agente reductor para formar nanopartículas de oro y
(b) tratamiento de las nanopartículas de oro obtenidas en la etapa (a) con el péptido de fórmula (I).

En la etapa (a) se forman las nanopartículas de oro.

10

En una realización particular, el agente reductor de la etapa (a) se selecciona del grupo que consiste en NaBH_4 , H_2O_2 , hidroxilaminas (como por ejemplo sulfato de hidroxilamina, hidroxilamina-O-ácido sulfónico y clorhidrato de hidroxilamina), tetrahidropiridinas (como por ejemplo, 1,3-bis(4-octadeciloxi-1,2,5,6-tetrahidropiridilmetil)benzeno), 1,3-bis(4-deciloxi-15 1,2,5,6-tetrahidropiridilmetil)benzeno) y 1,3-bis(4-metil-1,2,5,6-tetrahidropiridilmetil)benzeno), ácido oxálico, ácido cítrico y ácido ascórbico; preferiblemente el agente reductor es citrato sódico.

En otra realización particular, el procedimiento de la etapa (a) se lleva a cabo en un disolventes seleccionado del grupo que consiste en agua, tolueno, diclorometano, 20 acetonitrilo, dimetilsufóxido, dimetilformamida, acetona, etanol metanol, y mezcla de los mismos; preferiblemente en agua.

En una realización particular la reacción de reducción de la etapa (a) se lleva a cabo a una 25 temperatura de entre 80 °C y 120 °C, más preferiblemente de entre 90 °C y 110 °C, aún más preferiblemente de entre 95 °C y 105 °C, lo más preferido a aproximadamente 100 °C.

En otra realización particular, el compuesto de Au(III) que se reduce a Au0 en la etapa (a) se selecciona del grupo que consiste en óxido de oro (III) (Au_2O_3), haluros de oro incluyendo 30 AuCl y AuBr, preferiblemente el compuesto de Au(III) es HAuCl_4 .

Una vez obtenidas las nanopartículas de oro, se realiza la etapa (b) de tratamiento con el péptido de fórmula (I). Preferiblemente dicho tratamiento se realiza mediante agitación de una mezcla, generalmente una dispersión, de las nanopartículas de oro obtenidas y el 35 péptido de fórmula (I). Dicho tratamiento se realiza preferiblemente añadiendo el péptido (I) a la mezcla resultante de la reacción de formación de las nanopartículas de oro.

Por ello, en una realización particular, el procedimiento de la etapa (b) se lleva a cabo en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en agua, tolueno, diclorometano, acetonitrilo, dimetilsufóxido, dimetilformamida, acetona, etanol, metanol y mezcla de los mismos, preferiblemente en agua.

En particular, el tratamiento se realiza por agitación a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C, preferiblemente entre 20 °C y 25 °C. En particular, dicho agitación se mantiene durante 3 a 5 h, preferiblemente aproximadamente durante 4 h.

Los siguientes ejemplos no limitativos ilustrarán de manera adicional realizaciones específicas de la invención.

Ejemplos

Ejemplos 1-6. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro y composiciones de péptidos

Materiales y métodos

Citrato de sodio tribásico dihidratado y tetracloroaurato de hidrógeno (HAuCl₄) de (Sigma Aldrich).

El espectro de Ultravioleta visible de las tres muestras de nanopartículas de oro (GNP, GNP-P1 y GNP-P2) fueron determinados en agua usando un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu (Parc Científic de Barcelona) y cubetas de cuarzo (Hellma Analytics). El espectro de Uv-visible de cada muestra fue determinado en agua a una concentración de 1 mg/mL.

El tamaño de las nanopartículas (GNP, GNP-P1 y GNP-P2) fue determinado por Dispersión dinámica de la luz (DLS) para lo cual se utilizaron cubetas de cuarzo y un Zetasizer Nano ZS serie (Malvern Instruments, del Instituto de Química Avanzada de Cataluña). La preparación de las muestras consiste en 1 mg si es polvo y se suspende en 1 mL de H₂O milliQ. En el caso de muestras líquidas se toma con pipeta automática una alícuota de 100 µL de la muestra a la cual se le añade 900 µL de H₂O milliQ de tal forma que siempre tengamos una concentración de 1 mg/mL de muestra. Posteriormente se procede a la medida del tamaño

de partícula a una temperatura de 25 °C. Las medidas fueron realizadas por triplicado con el objetivo de demostrar la reproducibilidad de las mismas.

El potencial Z de las nanopartículas sintetizadas fue determinado utilizando cubetas
5 DTS1070 de plástico y un Zetasizer Nano ZS serie (Malvern Instruments, del Instituto de Química Avanzada de Cataluña, CSIC). La preparación de las muestras consiste en 1 mg si es polvo y se suspende en 1 mL de H₂O milliQ. En el caso de muestras líquidas se toma con pipeta automática una alícuota de 100 µL de la muestra a la cual se le añade 900 µL de H₂O milliQ de tal forma que siempre tengamos una concentración de 1 mg/mL de muestra.
10 Posteriormente se procede a la medida del potencial Z a una temperatura de 25 °C. Las medidas fueron realizadas por triplicado con el objetivo de demostrar la reproducibilidad de las mismas.

Ejemplos 1-3: Síntesis de nanopartículas GNP-P1, GNP-P2 y GNP

15

Las nanopartículas de oro (ejemplos 1-3) se sintetizaron utilizando el método de Turkevich basado en la reducción de Au(III) a Au(0) utilizando citrato de sodio como reductor y el péptido de fórmula correspondiente como agente estabilizante o en ausencia de péptido:

- Ejemplo 1: GNP-P1, en donde P1 es el péptido de fórmula (I);
- 20 - Ejemplo 2: GNP-P2, en donde P2 es el péptido de fórmula (II) (P2; Palm-L-Cys-L-Lys-L-Thr-L-Thr-L-Lys-L-Ser-L-Cys-L-Thr-L-Thr-L-Lys-L-Ser-OH; Palm-SEQ ID NO: 2);
- Ejemplo 3: GNP sin péptido.

donde GNP se refiere a nanopartículas de oro.

25

Las nanopartículas de oro (GNP, GNP-P1 y GNP-P2) fueron sintetizadas de la siguiente forma:

En un matraz de 10 mL que contiene 3 mL de agua fue añadido 5,76 mg de citrato sódico
30 utilizado como agente reductor. Posteriormente la solución se mantuvo bajo reflujo (100°C) durante 5 minutos. Luego se añadió 0,6 mg de sal de oro (HAuCl₄) hasta la aparición de una dispersión coloidal de color rojo oscuro indicando que se ha completado la reducción del Au(III) a A(0) lo cual conlleva a la obtención de nanopartículas de oro estables en el tiempo llamadas GNP. Una vez obtenidas las nanopartículas de oro funcionalizadas con citrato
35 sódico (GNP) se dejó enfriar a temperatura ambiente y fue añadido el péptido de fórmula (I) (P1) o el péptido de fórmula (II) (P2) en cantidades de 1 y/o 3 mg. La dispersión fue

mantenida bajo agitación durante 4 h garantizando así la adecuada funcionalización del péptido de fórmula (I) o (II) en la superficie de oro obteniéndose las nanopartículas de oro llamadas GNP-P1 y/o GNP-P2, respectivamente.

5 La concentración del péptido (P1 o P2) incorporado en las nanopartículas (GNP-P1 y/o GNP-P2) fue determinada por HPLC, para lo cual se usó un detector de fotodiodos Waters instrument 996 equipado con un módulo de separación Waters 2695 y el software Millenium. Se utilizó columna de fase inversa HPLC Xbridge BEH130 C18 4,6x100 mm 3,5 µm de Waters. La detección UV se realizó a 220 nm, y el gradiente de 5 a 100% de fase móvil B
10 durante 8 minutos a una velocidad de flujo de 1,0 ml / min. El tiempo de retención en estas condiciones es de 6,4 min para ambos péptidos P1 y P2. Fase móvil A: 0,045% de TFA / H2O, fase móvil B: 0,036% de TFA / ACN.

Ejemplos 4-5: Preparación de composiciones de péptido P1 y P2

15 También se prepararon composiciones del péptido de fórmula (I) (P1; ejemplo 4) y del péptido de fórmula (II) (P2; ejemplo 5) en ausencia de nanopartículas disolviendo el péptido correspondiente en agua. Se disolvieron 0,3 mg de los péptidos de fórmula (I) (P1) y/o (II) (P2) en 1 mL de agua para tener la misma concentración de péptido en las nanopartículas y
20 en ausencia de las mismas (0,3 mg/mL).

Ejemplo 6: Preparación de composición de péptido P1 y nanopartículas de oro sin conjugar

Por último, se preparó una composición del péptido de fórmula (I) y nanopartículas de oro
25 sin conjugar (GNP+P1), ejemplo 6.

Se preparó una mezcla de nanopartículas de oro sin conjugar (GNP) con el péptido de fórmula (I) (P1) ambos a una concentración de 0,3 mg/mL de agua. Se agitó la mezcla durante 5 minutos (GNP+P1) e inmediatamente se utilizó para la realización de las pruebas
30 correspondientes (degradación por proteasas y penetración en piel de cerdo).

Caracterización de nanopartículas de oro

Las nanopartículas se caracterizaron por espectroscopia de absorción ultravioleta visible
35 (UV-visible), DLS (*Dynamic Light Scattering*) y potencial zeta.

La formación de las nanopartículas (GNP, GNP-P1 y GNP-P2) fue confirmada por espectroscopia de UV-visible donde en todos los casos se observó la banda de la superficie plasmónica de resonancia (SPR) característica de las nanopartículas de oro con un valor entre 510 y 526 nm.

5

En la tabla 1 a continuación se muestran los resultados obtenidos para las nanopartículas sintetizadas.

Tabla 1

<i>Ejemplo</i>		<i>Diámetro nanopartículas (nm)</i>	<i>Potencial zeta nanopartículas (mV)</i>	<i>Concentración máxima de péptido en las nanopartículas (mg/ml)</i>
1	GNP-P1	150-200	-35	0,3
2	GNP-P2	150-200	-59	0,3
3	GNP	20-50	-40	-

10

Ejemplo 7. Penetración cutánea

Materiales y métodos

15 Se determinó la penetración cutánea utilizando células de Franz. Las muestras de piel de cerdo utilizadas en los experimentos se cortaron en círculos de 3 cm de diámetro. La piel de cerdo se montó sobre el compartimento receptor de un sistema de célula de difusión de Franz con el estrato córneo orientado hacia arriba al compartimento dador. Se utilizaron 18 ml de tampón fosfato salino (PBS) con solución del receptor. Se aplicó una alícuota de las

20 muestras de ensayo (nanopartículas del ejemplo 1 (GNP-P1), nanopartículas del ejemplo 2 (GNP-P2), nanopartículas del ejemplo 3 (GNP), formulación de péptido P1 del ejemplo 4, formulación de péptido P2 del ejemplo 5, mezcla de nanopartículas y péptido P1 GNP+P1 del ejemplo 6 sobre la piel de cerdo. Las células de difusión de Franz se montaron sobre un

25 termostático (Haake).

También se incluyó un control de piel sin tratar. Las células de difusión de Franz se mantuvieron a 32 °C y, tras 20 h de incubación, la solución receptora se analizó mediante espectroscopia de absorción UV-visible usando un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu

30 (Parc Científic de Barcelona) y cubetas de cuarzo (Hellma Analytics), para cuantificar la

cantidad nanopartículas de oro presentes (GNP, GNP-P1 y GNP-P2). La cantidad de péptido libre (P1, P2) se determinó mediante HPLC para lo cual se usó un detector de fotodiodos Waters instrument 996 equipado con un módulo de separación Waters 2695 y el software Millenium. Se utilizó columna de fase reversa HPLC Xbridge BEH130 C18 4,6x100
5 mm 3,5 µm de Waters. En ambos casos la detección UV se realizó a 220 nm. En el caso del del péptido P1 se analizó con un gradiente de 5 a 100% de fase móvil B durante 8 minutos a una velocidad de flujo de 1,0 ml / min, siendo el tiempo de retención 6,5 minutos. El péptido P2 se analizó con un gradiente de 0 a 20% de fase móvil B durante 8 minutos a una velocidad de flujo de 1,0 ml / min, siendo el tiempo de retención 1,5 minutos. Los eluyentes
10 utilizados en ambos casos fueron: Fase móvil A: 0,045% de TFA / H₂O, fase móvil B: 0,036% de TFA / ACN.

Resultados

15 En la Figura 1 se muestran los resultados de penetración tras 20 h de incubación. Como se puede observar, hay un aumento considerable en la penetración al conjugar el péptido de fórmula (I) con nanopartículas de oro. Sin embargo, dicho aumento en la penetración no se observa con el péptido de fórmula (II).

20 Los resultados obtenidos tras el análisis de las soluciones receptoras mostraron con el péptido (1) (ejemplo 4; P1) solamente penetró en las capas más externas de la piel, mientras que en el caso de las pieles tratadas con la nanopartícula de oro (ejemplo 1; GNP-P1) se logró obtener un alto contenido de la nanopartícula conjugada con el péptido, indicando que ha logrado penetrar en capas más internas como es el caso de la epidermis y
25 dermis.

Ejemplo 8. Degradación de péptido por proteasas

Materiales y métodos

30

Se disolvieron 10 ml de cada uno de los péptidos libres (P1, P2) en 2 ml de tampón fosfato salino (PBS) para dar una solución correspondiente con una concentración de 5 mg/ml de péptido.

Se disolvieron 40 mg de cada una de las nanopartículas preparadas GNP-P1, GNP+P1 y GNP-P2 con un contenido del 1% de péptido en 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) para dar una solución final con una concentración de 40 mg/ml de nanopartículas.

- 5 Se añadió papaína (Fagon, España) (20 mg a las soluciones de péptido libre o 1,5 mg a las soluciones de nanopartículas). Las soluciones resultantes se incubaron a 40 °C. A los tiempos de estudio (0 h, 0,33 h, 3 h y 24 h tras la adición de papaína) se tomaron muestras, se centrifugaron a 1400 rpm durante 1 min y el sobrenadante se filtró utilizando un filtro de 0,45 µm y se analizó por HPLC.

10

El análisis de HPLC se llevó a cabo en un instrumento Waters 996 con detector de matriz de diodos equipado con el módulo de separación Waters 2695 y el software Millenium; se utilizó una columna de fase inversa Xbridge BEH130 C18 4,6x200 mm 3,5 µm de Waters. La detección UV se realizó a 220 nm y un gradiente de fase móvil B de 5 a 100% durante 8 minutos a 1,0 ml/min de flujo. En estas condiciones, el tiempo de retención de P1 es de 6,4 min. Fase móvil A: 0,045% TFA/H₂O, fase móvil B: 0,036% TFA/acetonitrilo.

15

Resultados

- 20 Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 2. Como se puede observar, el péptido de fórmula (I) conjugado con nanopartículas de oro (GNP-P1) presenta una estabilidad inesperada frente a la degradación con papaína, mientras que el péptido de fórmula (I) solo (P1) o en combinación con nanopartículas de oro pero sin conjugar (GNP+P1) se degradan rápidamente. Del mismo modo el péptido de fórmula (II) conjugado con nanopartículas de oro (GNP-P2) también se degrada rápidamente por acción de la papaína.

25

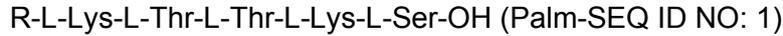
Tabla 2

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Estabilidad (%)</i>				
	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>GNP-P1</i>	<i>GNP+P1</i>	<i>GNP-P2</i>
0	100	100	100	100	100
0,33	30	10	88	25	15
3	0	0	86	0	0
24	0	0	90	0	0

30

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas de oro conjugadas con un péptido de fórmula (I):



5 (I).

en el que R es un resto acilo C₁₀-C₂₂.

2. Nanopartículas según la reivindicación 1 en las que el resto R es un resto palmitoílo.

10 3. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque su diámetro medio es inferior a 500 nm.

4. Nanopartículas según la reivindicación 3, caracterizadas porque su diámetro medio está comprendido entre 50 y 200 nm.

15

5. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque presentan un potencial zeta comprendido entre -5 mV y -60 mV.

20 6. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de péptido de fórmula (I) es de 0,01 a 1 mg de péptido (I) por mg de nanopartículas.

7. Composición que comprende las nanopartículas definidas en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y agua.

25

8. Composición según la reivindicación 7, caracterizada porque contiene al menos 95% (p/p) de agua con respecto a la suma del peso de agua y nanopartículas en la composición.

30 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 caracterizada porque comprende además un agente cosmético seleccionado del grupo que consiste en tensioactivos, agentes hidratantes, antioxidantes, emolientes, conservantes, humectantes, modificadores de la viscosidad y mezclas de los mismos.

10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizada porque está en forma de una crema, un suero, una emulsión, un gel, una espuma, una pasta, un ungüento, una leche o una solución.
- 5 11. Uso de nanopartículas según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de una composición según se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
- 10 12. Uso de nanopartículas según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de una composición según se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para el cuidado de la piel.
13. Uso según la reivindicación 12, en donde el cuidado de la piel es el tratamiento cosmético de arrugas y/o prevención cosmética de la aparición de arrugas.
- 15 14. Procedimiento para la obtención de nanopartículas según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:
(a) reducción de Au(III) de un compuesto que contiene dicho Au(III) a Au(0) mediante tratamiento con un agente reductor para formar nanopartículas de oro y
20 (b) tratamiento de las nanopartículas de oro obtenidas en la etapa (a) con el péptido de fórmula (I).
15. Procedimiento según la reivindicación 14, en donde el agente reductor de la etapa (a) es citrato sódico.
- 25 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, caracterizado porque las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en agua.
- 30 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 en donde el compuesto de Au(III) de la etapa (a) es H₂AuCl₄.

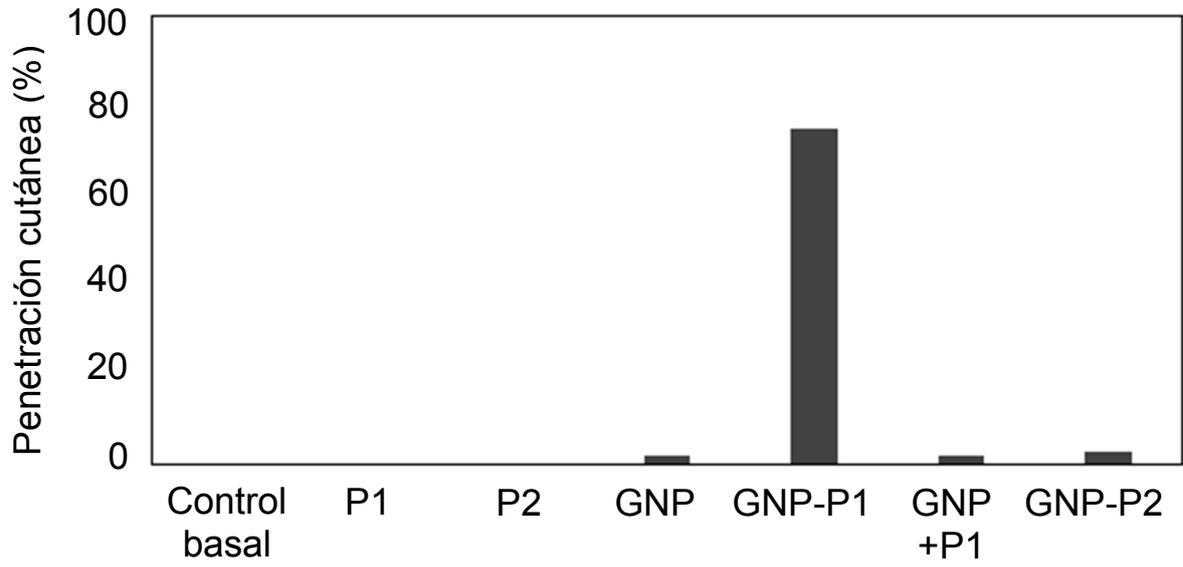


FIG. 1



- ②① N.º solicitud: 201830311
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.03.2018
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2008079898 A1 (PHARMWEST INC et al.) 03/07/2008, párrafos [0013], [0021], [0046], [0048] y [0112]; y reiv. 44	1-17
A	WO 0015188 A1 (SEDERMA SA et al.) 23/03/2000, todo el documento.	1-17
A	GUPTA R et al. Effect of size and surface charge of gold nanoparticles on their skin permeability: a molecular dynamics study. Scientific Reports 3 Feb. 2017 Nature Publishing Group UK. , 03/02/2017, Vol. 7, Páginas 45292 (13 pp.), ISSN 2045-2322 (print), <DOI: doi:10.1038/srep45292>. apartado "Results and Discussion"	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.12.2018

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K8/65 (2006.01)

A61K9/51 (2006.01)

A61Q19/08 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61Q, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, INSPEC/IEE y bases de datos TXT