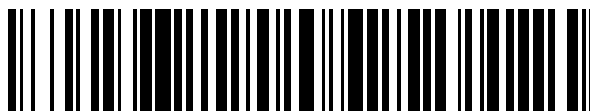


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 874**

51 Int. Cl.:

A61K 47/61 (2007.01)

A61P 39/06 (2006.01)

C07D 233/64 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2015 PCT/IB2015/055782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16016847**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2015 E 15767274 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3174555**

54 Título: **Derivados obtenidos a partir de ácido hialurónico y carnosina**

30 Prioridad:

31.07.2014 IT MI20141395

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2019

73 Titular/es:

SCIUTO, SEBASTIANO (33.3%)
Via G. Donizetti 7
95030 Pedara (CT), IT;
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
(33.3%) y
FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (33.3%)

72 Inventor/es:

GRECO, VALENTINA;
RIZZARELLI, ENRICO;
BELLIA, FRANCESCO;
LANZA, VALERIA;
VACCARO, SUSANNA;
MESSINA, LUCIANO y
SCIUTO, SEBASTIANO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 725 874 T3

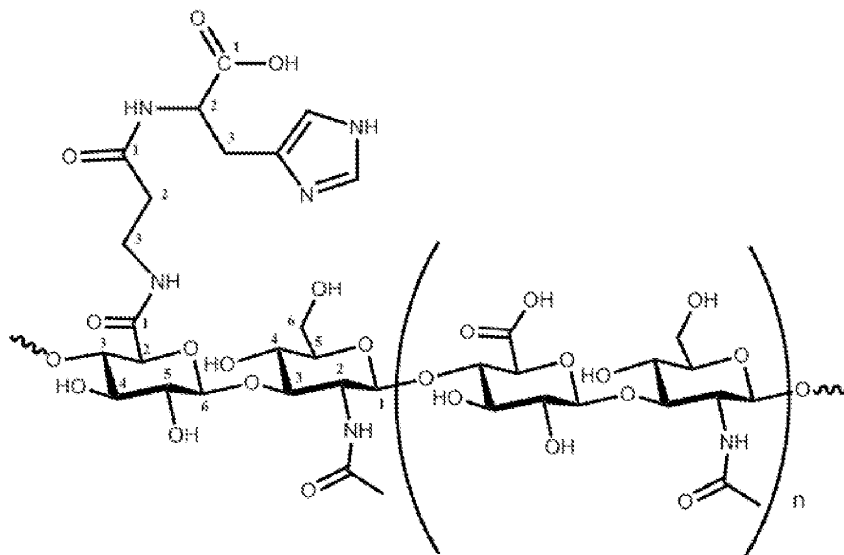
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados obtenidos a partir de ácido hialurónico y carnosina

La invención se refiere a un derivado de carnosina (β -alanil-L-histidina) que tiene la fórmula (1), obtenido mediante la funcionalización de ácido hialurónico con carnosina.

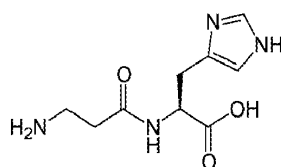
- 5 Más específicamente, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula (1)



(1)

es decir 3-N-hialuronilo conjugado de ácido 2-(3-aminopropanamido)-3-(1H-imidazol-4-il)propanoico o hialuronil-carnosina o ácido 3-(1H-imidazol-4-il)-2-(3-hialuronamidopropanamido)propanoico.

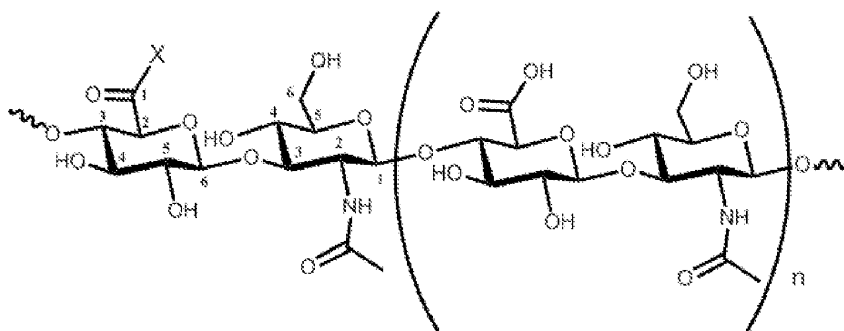
- 10 El compuesto que tiene la fórmula (1) indicado anteriormente es el conjugado entre dipéptido de carnosina que tiene la fórmula (2)



(2)

y ácido hialurónico, en donde la conjugación se obtiene mediante la formación de un enlace amida entre el grupo NH_2 de la carnosina, preferiblemente protegida en el grupo carboxilo, con uno o más grupos carboxilo del ácido hialurónico, preferiblemente de un derivado activo de ácido hialurónico, aún más preferiblemente de un éster de COX que tiene la fórmula (3)

15



(3)

La invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de 3-N-hialuronilo conjugado de ácido 2-(3-aminopropanamido)-3-(1H-imidazol-4-il)propanoico (HyCar) y las formulaciones que contienen el mismo para uso farmacéutico, cosmético y nutracéutico con una actividad antioxidante, cicatrizante, quelante, gastroprotectora (como un complejo con Zn^{2+}), glucomoduladora, inmunomoduladora, antitumoral, antigenotóxica, neuroprotectora, contra la glicación, antifibrillogénica, una actividad contra el envejecimiento del sistema nervioso central, una actividad protectora para el daño debido a isquemia/reperfusión, una actividad nefroprotectora, hepatoprotectora.

El proceso de respiración celular genera un subproducto importante y potencialmente peligroso: el radical superóxido $O_2^{\cdot-}$, que puede reaccionar, dañándolas, con macromoléculas biológicas tales como proteínas, ADN y lípidos, y puede generar otras especies muy reactivas (ROS) tales como $\cdot OH$, $RO_2^{\cdot}$, $ROOH$, $RO^{\cdot}$, H_2O_2 y $ONOO^{\cdot}$, que son potencialmente agresivas con respecto al sistema celular. Todos los organismos aerobios tienen mecanismos de defensa contra el radical $O_2^{\cdot-}$, entre los que los principales son enzimas superóxido dismutasa (SOD) que catalizan la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ en O_2 y H_2O_2 . El peróxido de hidrógeno así producido, a su vez, se transforma en H_2O mediante la catalasa y mediante la glutatona peroxidasa, evitando así la formación del radical $\cdot OH$ que se generaría mediante la reacción de Fenton ($Fe(II)^+ + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + \cdot OH + \cdot OH$). Bajo ciertas afecciones patológicas (procesos inflamatorios, lesión por reperfusión, ataques cardíacos, enfermedad de Alzheimer, ALS, etc.), las enzimas SOD pueden ser insuficientes para eliminar el exceso de $O_2^{\cdot-}$ producido, y los tejidos biológicos, en estos casos, pueden sufrir un daño adicional. En algunos tejidos de vertebrados, tales como los músculos o el cerebro, caracterizados por un nivel superior de metabolismo oxidativo, se ha encontrado un nivel superior de moléculas pequeñas con una actividad antioxidante tales como glutatona y otros péptidos (carnosina, homocarnosina, anserina, etc.) que tienen la función de reforzar la protección contra procesos de estrés oxidativo. La actividad protectora de estos péptidos con respecto a ROS se ha analizado y demostrado ampliamente en la bibliografía ((Biochim. Biophys. Acta 1570, 89, 2002; Mol. Cells 13, 498, 2002; Biochem. J. 967, 241, 1988).

Para la carnosina, en particular, con respecto a sus propiedades antirradicálicas y antiperoxidativas, estudios preclínicos han demostrado su capacidad para prevenir, y en algunos casos, curar, las cataratas (Biochem. Int. 15, 1105, 1987; Biochim. Biophys. Acta 1004, 363, 1989). La actividad antiinflamatoria se ha demostrado en tejidos del sistema digestivo, en los ojos y la piel (documentos US4508728 A, DE4316293, WO 01/52808 A). Además, la carnosina ha mostrado efectos inhibidores con respecto a la oxidación de LDL humana inducida por $Cu(II)$ (Eur. J. Med. Chem. 43, 373, 2008), y su actividad *eliminadora* con respecto al radical hidroxilo se ha demostrado específicamente (Helv. Chim. Acta 85, 1633, 2002). Con respecto al mecanismo que permite que la carnosina contrarreste los efectos patológicos del estrés nitrosativo, se ha demostrado que la interacción directa con óxido nítrico es uno de los caminos posibles (J. Neurosci. Res. 85, 2239, 2007), mientras que solo el dipéptido natural reduce drásticamente la cantidad de óxido nítrico liberada por un *no donante*. Más recientemente, se ha demostrado la eficacia de la carnosina para reducir la activación de PARP-1, y también PARP-2, después de la inducción de estrés oxidativo (Neurochem. Res. 35, 2144, 2010; Mol. Aspects Med. 32, 258, 2011). Por otra parte, la L-carnosina, análogamente a la N-monometil-arginina (conocido inhibidor de iNOS) regula a la baja la expresión de PRAP-1 (Neurochem. Res. 38, 50, 2013).

También es interesante observar que los complejos de carnosina con $Cu(II)$ muestran una actividad sinérgica contra dos especies tóxicas de radicales, $O_2^{\cdot-}$ y $HO^{\cdot}$ (Dalton Trans. 4406, 2003). Paralelamente, se ha observado que la presencia de carnosina, anserina, homocarnosina y otros péptidos similares mejora la absorción intestinal de cinc, mejorando, en la práctica, la biodisponibilidad. Este hecho es particularmente interesante en el síndrome de deficiencia de cinc y en enfermedades intestinales inflamatorias (Biomed. Res. Trace Elem. 12, 159, 2001).

La naturaleza peptídica de la carnosina mejora diversas restricciones en su uso, asociadas con su degradabilidad sobre la parte de peptidasas específicas. El uso de N-acetil-carnosina (documento WO 95/10294 A), que se degrada mucho más lentamente que la carnosina libre (Clin. Chim. Acta 254, 1-21, 1996), se ha propuesto para vencer esta limitación. Con el mismo propósito, también se ha usado la derivación de la carnosina con ciclodextrinas, a saber con compuestos ampliamente usados como vehículos de fármacos, a través de la formación de una amina secundaria (documento EP 1176154 A). En este caso, la ciclodextrina estabiliza el dipéptido, protegiéndolo de la actividad hidrolítica de la carnosinasa, según se demuestra para sistemas similares (J. Am. Chem. Soc. 120, 7030, 1998), permitiendo por consiguiente que la carnosina ejerza su efecto biológico, favorecido por la presencia del oligosacárido que elimina los radicales $\cdot OH$ (Helv. Chim. Acta 85, 1633, 2002). Basándose en la misma teoría, se patentó posteriormente un compuesto conjugado de carnosina con trehalosa (documento EP 1860116 A1), como un sistema con actividades antioxidante, antiglicante y antiplaquetaria. Además, en este caso, la carnosina se conjuga por medio de enlaces con los grupos funcionales $-OH$ de la trehalosa, formando aminas secundarias. El enlace así formado, ciertamente más estable que el obtenible por medio de un enlace iónico, no solo protege la carnosina al menos parcialmente de la degradación enzimática, sino que se beneficia de la capacidad conocida de la trehalosa para proteger a las proteínas de cambios de conformación debidos a agentes desnaturalizantes.

El compuesto que tiene la fórmula (1), objeto de la presente invención, se obtiene, por el contrario, mediante la conjugación covalente de carnosina con ácido hialurónico, a través de la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo del HA y un grupo amina de la carnosina. El ácido hialurónico es un polímero que consiste en unidades de disacárido repetitivas, compuestas por ácido glucurónico (ácido β -D-glucopirranurónico) y acetilglucosamina (2-acetilamino-2-desoxi- β -D-glucopiranosio), unidos entre sí por medio de un enlace glicosídico entre el átomo de carbono anómero del primero y el C-3 de la acetilglucosamina. Las unidades de disacárido, a su vez, están unidas

entre sí por medio de enlaces glicosídicos entre el carbono anómero de la acetilglucosamina de una unidad de disacárido y el C-3 del residuo de ácido glucurónico perteneciente a la siguiente unidad de disacárido, formando cadenas lineales de longitud variable. El peso molecular (PM) medio del HA depende de su longitud, siendo dicho PM extremadamente variable, dependiendo de las fuentes a partir de las cuales se obtiene el HA. En particular, el HA empleado en la presente invención se puede obtener mediante extracción (por ejemplo de crestas de gallo), mediante fermentación o mediante biosíntesis, teniendo un PM medio de entre 90 y 230 kDa, preferiblemente entre 180 y 210 kDa. Un intervalo adicional de PM medio útil para el propósito de la presente invención está comprendido entre 500 y 730 kDa. En la presente descripción, PM medio significa "PM medio en peso", calculado según el método de la "viscosidad intrínseca" (Terbojevich et al., Carbohydr Res, 1986, 363-377). El ácido hialurónico (HA) es un polímero biodegradable natural con una variedad de aplicaciones en medicina, incluyendo andamiajes moleculares para manipulación tisular y viscosuplementación para el tratamiento de la osteoartritis. El ácido hialurónico se usa actualmente en el campo cosmético debido a sus propiedades protectoras y humectantes. Representa uno de los constituyentes principales de la matriz extracelular (ECM) de los tejidos de los vertebrados, y se puede encontrar en casi todos los fluidos y tejidos del cuerpo, tales como el fluido sinovial, el humor vítreo y el cartílago hialino (Biomedical applications of hyaluronic acid. ACS Publications, p. 155-74, 2006; Biomaterials 25, 1339, 2004; Calcified Tissue Int. 7, 175, 1971; Dumitriu S., Polymeric biomaterials. Nueva York: Marcel Dekker, 2002. ISBN:0-8247-8969-5). Este biopolímero actúa como un andamiaje molecular y está conectado a otras moléculas de la matriz, entre ellas agregano (Garg H. G., Hales C. A., Chemistry and biology of hyaluronan. Oxford: Elsevier Science, 2004. ISBN:978-0-08-044382-9).

El HA también tiene un papel en diversas funciones biológicas tales como la regulación de la adhesión y la movilidad celulares, la manipulación de la diferenciación y la proliferación celulares y provee a los tejidos de propiedades mecánicas (Biomaterials 25, 1339, 2004). Se ha demostrado que algunos receptores de la superficie celular (tales como CD44, RHAMM y ICAM-1) interactúan con HA influyendo en algunos procesos celulares entre ellos morfogénesis, cicatrización, inflamación y metástasis (Biomaterials 26, 359-71, 2005; Nat. Rev. Cancer 4, 528, 2004; J. Surg. Res. 147, 247, 2008; J. Cell. Sci. 103,293, 1992). El HA también es responsable de la viscoelasticidad de algunos fluidos biológicos (fluido sinovial, humor vítreo) y controla la hidratación tisular y el transporte de agua (Vet. Med. 53, 397, 2008). Además, el HA se ha encontrado, durante el desarrollo embrionario, en el cordón umbilical, sugiriendo que los materiales compuestos de HA pueden inducir condiciones favorables para la regeneración y el crecimiento de tejidos (Acta Biomater. 6, 2407, 2010; Biomaterials 28, 1830, 2007; J. Control. Release 69,1 69, 2000; Chem. Rev. 101, 1869, 2001; Biomaterials 24, 4337, 2003).

Las características del HA, incluyendo su consistencia, biocompatibilidad e hidrofilia, lo han convertido en un excelente humectante usado en dermatología cosmética y en productos para el cuidado de la piel (Vet. Med. 53, 397, 2008).

En la solicitud de patente WO 2012/076961 A2, se reivindica un compuesto que comprende ácido hialurónico salificado, o al menos parcialmente salificado, con carnosina; el objetivo del inventor de esta solicitud de patente es obtener preparaciones que ofrezcan las propiedades biofarmacológicas de ambos compuestos. En este caso, sin embargo, debido a la naturaleza iónica del enlace que mantiene los dos principios activos juntos, cuando el compuesto reivindicado alcanza los fluidos biológicos, liberará inmediatamente carnosina libre que será destruida rápidamente por la carnosinasa sérica. El conjugado que tiene la fórmula (1), objetivo de la presente invención, por el contrario y según se consideró previamente, se caracteriza por la presencia, entre la carnosina y el ácido hialurónico, de un enlace covalente de tipo amida que no es inmediatamente hidrolizable; la carnosina, en su forma conjugada, es por lo tanto más resistente a la acción de la carnosinasa sérica y el compuesto que tiene la fórmula (1) mantiene la carnosina conectada e intacta durante un período que es suficiente para permitir que la misma carnosina alcance el sitio donde ejerce su acción, dando un efecto técnico de liberación lenta.

De un modo muy sorprendente, el Solicitante ha encontrado y demostrado que este enlace no solo, como se espera, frena la liberación de carnosina, siendo menos hidrolizable que los enlaces previamente descritos, sino que da principalmente al compuesto de fórmula (1) una actividad antioxidante que es extremadamente alta. La conjugación de HA y carnosina a través de un enlace amida que se reivindica en la presente incrementa el efecto biológico de la carnosina hasta un grado definitivamente superior que el efecto debido a una simple protección de la hidrólisis enzimática, y esto era completamente inesperado dado que el HA como tal no tiene actividad antioxidante.

A la luz de lo anterior, la presencia de ácido hialurónico en el conjugado objeto de la presente invención potencia sinérgicamente la acción contra los procesos oxidativos ya presentes en la carnosina, garantizando en la última una estabilidad considerable con respecto a la carnosinasa sérica y confiriendo por consiguiente una actividad superior con respecto a la carnosina como tal o como derivado acetilado.

El porcentaje de grupos carboxílicos de ácido hialurónico conjugados a través del enlace amida con carnosina varía de 2 a 25%, preferiblemente de 5 a 20% y aún más preferiblemente es igual a 7% de los grupos ácido carboxílico totales del HA.

Un objetivo de la presente solicitud de patente también se refiere al complejo con Cu (II) del conjugado que tiene la fórmula (1).

De hecho, se evaluó la actividad antioxidante de tipo SOD del complejo con Cu (II) del conjugado que tiene la fórmula (1), verificándola *in vitro* por comparación con el complejo con Cu (II) de carnosina libre y con el complejo con Cu (II) de ácido hialurónico no conjugado. Los resultados mostraban que la actividad del complejo con Cu (II) que tiene la fórmula (1) es extraordinariamente superior con respecto a la actividad de los correspondientes complejos de carnosina o ácido hialurónico.

Un objeto de la presente invención también se refiere a un procedimiento para la preparación del compuesto que tiene la fórmula (1), en el que un derivado de ácido hialurónico se conjuga covalentemente con carnosina protegida en el grupo carboxilo. De hecho, el compuesto que tiene la fórmula (1) según la presente invención se sintetizó partiendo de ácido hialurónico adecuadamente activado con carnosina protegida en el grupo carboxilo. El derivado activo de ácido hialurónico es preferiblemente un éster y aún más preferiblemente es el éster de 3-hidroxi-1,2,3-benzotriacina-4(H)-ona (HOBT), mientras que el dipéptido de carnosina se usa preferiblemente en la forma de éster metílico.

Se pueden usar con este propósito otros ésteres de carnosina u otros derivados activos de ácido hialurónico, equivalentes al éster de HOBT.

El compuesto que tiene la fórmula (1) mostraba mayor resistencia a la acción de carnosinasa sérica humana con respecto a la carnosina no conjugada.

Un objeto de la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas, cosméticas o nutracéuticas, que comprenden el compuesto que tiene la fórmula (1) como principio activo. Considerando las propiedades antioxidantes, antiglicantes, antiplaquetarias y quelantes con respecto a metales de transición, las composiciones que contienen el compuesto que tiene la fórmula (1) se pueden usar para el tratamiento o la prevención de condiciones en las que la formación de radicales libres o la conformación de proteínas deteriorada, debidas tanto a glicación como a otras causas, tienen un papel patógeno. Ejemplos de estas afecciones comprenden: cataratas, ojo seco, envejecimiento de la piel, heridas, lesiones gástricas, diabetes, respuesta inmunomoduladora deteriorada, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, patologías tumorales y neurológicas (envejecimiento del sistema nervioso central, enfermedad de Alzheimer), daño debido a isquemia/reperfusión.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, cosméticas o nutracéuticas, que comprenden el compuesto que tiene la fórmula (1) como principio activo, para el uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos o afecciones de la conformación de proteínas tales como cataratas, ojo seco, envejecimiento de la piel, heridas, lesiones gástricas, diabetes, respuesta inmunomoduladora deteriorada, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, enfermedades tumorales y neurológicas, daño debido a isquemia/reperfusión. De hecho, estas composiciones tienen una actividad cicatrizante, gastroprotectora, preferiblemente como un complejo con Zn^{2+} , glucomoduladora, inmunomoduladora, antitumoral, antigenotóxica, neuroprotectora, contra el envejecimiento del sistema nervioso central, una actividad protectora para el daño debido a isquemia/reperfusión, una actividad nefroprotectora y hepatoprotectora.

Las dosis y las vías de administración dependen de las condiciones que están generalmente determinadas por los expertos clínicos, variando habitualmente, sin embargo, de 100 a 5000 mg/día por vía oral, y de 0,1 a 10% en peso para formulaciones para uso tópico o sistémico (es decir, inyección).

Posibles ejemplos de formulaciones comprenden: cápsulas, comprimidos, gránulos, polvos, soluciones, pomadas, geles, gotas oculares y cualquier otra formulación conocida para el experto en la formulación.

Obviamente, las posibles vías de administración están relacionadas con la enfermedad que se va a tratar y, con propósitos ilustrativos, pueden incluir oral, tópica, local-regional, intramuscular, intradérmica, intraocular, intra- o periarticular, infusiva, etc.

Un ejemplo que ilustra la invención se proporciona posteriormente en la presente.

A menos que se indique otra cosa, se usaron reactivos disponibles comercialmente, tratados como sigue, cuando fuera necesario: metanol anhidro (SIGMA, MeOH), usado para la síntesis de éster metílico de carnosina, se mantuvo durante 24 horas sobre tamices moleculares de 4 Å antes de usarse.

Se sintetizó el éster metílico de carnosina (Car-OMe), tratando la carnosina (Sigma) con ácido clorhídrico en metanol a 0°C. Se usó cloruro de acetilo como fuente de HCl.

Los espectros de 1H -NMR se registraron en un instrumento Varian a 500 MHz (Inova 500), usando frecuencia de HOD como referencia.

Se efectuaron experimentos destinados a determinar la distribución del peso molecular (DPM) y la viscosidad intrínseca del HyCar conjugado en un sistema cromatográfico CPG/SEC equipado con un detector triple Malvern (ViscotekTDmax).

Las medidas de fluorescencia se efectuaron en un espectrofluorofotómetro SHIMADZU RF-5301 PC, mientras que las medidas de absorción UV-vis se efectuaron en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800 o Beckman DU 650.

La actividad de tipo SOD del complejo con Cu(II) de HyCar conjugado y las del complejo con Cu(II) de carnosina o HA se determinaron por medio de la prueba de Fridovich (Anal. Biochem. 44, 276, 1971).

A fin de preparar dichos complejos con Cu(II), se usó nitrato cúprico en solución acuosa a las siguientes concentraciones: $[L] = [Cu(II)] = 10^{-6}$ - 10^{-7} ; de hecho, es conocido por el experto que la carnosina forma fácilmente quelatos con metales de transición (Free Rad Res. Commun.; 1991, 12-13 pt.1, 179-185). Todos los productos químicos usados se adquirieron de Sigma.

El análisis de HPLC de los oligosacáridos producidos después de la digestión enzimática de HyCar o ácido hialurónico libre con hialuronidasa testicular bovina se llevó a cabo en un sistema cromatográfico Agilent 1200 con un detector de UV, usando una columna Supelcosil LC-SAX1 (25 x 4,6 cm; Supelco) y leyendo el perfil cromatográfico a una longitud de onda de 214 nm. Elución: flujo 1,2 ml/min; NaCl 50 mM (pH 4) isocrático durante 5 min, a continuación, programado hasta NaCl 1,2 M (pH 4) en 60 min.

Ejemplo

Síntesis de 3-*N*-hialuronilo conjugado de ácido 2-(3-aminopropanamido)-3-(1H-imidazol-4-il)propanoico (HyCar)

En un procedimiento de síntesis típico, un gramo de hialuronato sódico (195 KDa) se añadió, bajo agitación, a 20 ml de tetrahidrofurano (THF) frío a 5°C. Los siguientes productos se añadieron en secuencia a la suspensión resultante: 20 ml de una solución de H₂O/THF (1:1 v/v) que contenía 0,5 mmoles de HOBT, 10 ml de una solución de H₂O/THF (1:1 v/v) que contenía 0,2 mmoles de tris[2-(2-metoxietoxi)etil]amina y 5 ml de una solución de metanol que contenía 0,125 mmoles de éster metílico de L-carnosina. Después de 30 minutos a 5°C, se añadieron a la mezcla 10 ml de una solución de hidrócloruro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC·HCl; 0,25 mmoles) y toda la masa de reacción se dejó bajo agitación continua a 5°C durante 20 horas. Después de este período, la mezcla de reacción se trató con 100 ml de una solución de NaOH 0,1 N y se dejó en reposo a 5°C durante 3,5 horas más. En este punto, el pH de la mezcla se llevó hasta 7,0 con HCl 2 N y el conjugado se precipitó mediante la adición de 800 ml de acetona. A continuación, el producto de interés se retiró del sobrenadante mediante centrifugación y posteriormente se dializó frente a agua durante 60 horas. A continuación, el conjugado se recuperó y se liofilizó (rendimiento 70%).

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) (ppm) : 8,66 (singlete; H-2 del anillo de imidazol), 7,34 (singlete; H-5 del anillo de imidazol), 4,61-4,52 (multiplete ancho; H-6 de los residuos de ácido glucurónico, H-1 de los residuos de N-acetilglucosamina y H-2 de la cadena de ácido propanoico), 3,90-3,23 (multiplete ancho; H-2, H-3, H-4 y H-5 de los residuos de ácido glucurónico, H-2, H-3, H-4, H-5, 2H-6 de los residuos de N-acetilglucosamina y metileno C-3 del grupo propanamida), 3,17 (multiplete; 2H-3 de la cadena de ácido propanoico, 2,44 (multiplete; metileno C-2 del grupo propanamida), 2,06 (singlete ancho CH₃ de los residuos de N-acetilglucosamina). El espectro de ¹H NMR del HyCar conjugado con las principales asignaciones se indica en la Figura 1 que muestra las resonancias usadas para calcular el porcentaje de grupos carboxilo conectados con un puente de amida con unidades de carnosina (% de carga).

La cantidad de carnosina presente en el conjugado se determina a partir de la relación entre el valor de integración de la señal a 2,06 ppm (relativa a grupos acetilo de HA) y el valor de integración de la señal a 2,44 ppm (relativa a C-3 del grupo propanamida), o una de las señales de H-2 o H-5 del anillo de imidazol (a 8,66 y 7,34 ppm, respectivamente).

Siguiendo el procedimiento de síntesis descrito anteriormente, el porcentaje de grupos carboxilo presentes en la unidad de polisacárido del conjugado que formaba el enlace amida con carnosina resultaba ser igual a 7%. Al modificar adecuadamente las relaciones estequiométricas entre HA y los otros reactivos, se obtuvieron valores de conjugación de hasta 25%.

Viscosidad intrínseca y distribución del peso molecular del conjugado HyCar

Los parámetros indicados anteriormente se determinaron por medio de cromatografía de exclusión por tamaño llevada a cabo en el sistema cromatográfico GPCmax VE 2001 (Malvern), equipado con dos columnas TSK-GEL GMPWXL (7,8 mm ID x 30 cm; Viscotek- TOSOH BIOSCIENCE) instaladas en serie. El sistema está acoplado con un sistema de tres detectores situados en serie y que comprende: un detector del índice de refracción, un detector de dispersión de luz y un viscosímetro diferencial de cuatro capilares. La muestra se eluyó usando una solución acuosa 0,1 M de nitrato sódico que contiene 0,5 g/l de azida sódica con un flujo de 0,6 ml/min, a 40°C. Se usó el software Omniseq 4.1 para la adquisición y el análisis de datos.

La Figura 2 muestra un cromatograma típico obtenido para HyCar (carga 7%) que indica el comportamiento cromatográfico de una muestra de HyCar (7% de carga) en una columna TSK-GEL GMPWXL. La detección con triple detector se efectuó en un Viscotek TDA 302 (Malvern).

Los parámetros físicos relativos a la viscosidad intrínseca y el peso molecular (PM), determinados a diferentes concentraciones para el conjugado de ácido hialurónico-carnosina, en comparación con los del ácido hialurónico correspondiente, determinados por medio de cromatografía de exclusión por tamaño acoplada con un detector triple, se indican en la Tabla 1 posteriormente.

Tabla 1

Muestra	Conc. Teórica (mg/ml)	Conc. encontrada (mg/ml)	Peso molecular (PM)	Viscosidad intrínseca (dl/g)
HA 190kD (D)	0,5 mg/ml	0,513	190713	5,2
HA 190kD (E)	0,25 mg/ml	0,261	192830	5,2
HA 190kD (F)	0,1 mg/ml	0,109	194713	5,3
HyCar (7%)190kD	0,5 mg/ml	0,420	196758	4,8
HyCar (7%)190kD	0,25 mg/ml	0,205	200258	4,8
HyCar (7%)190kD	0,1 mg/ml	0,081	204370	4,9

La Figura 3 muestra, como un ejemplo, la gráfica de Mark-Howink (logaritmo de viscosidad hacia el logaritmo del peso molecular, PM) del conjugado de ácido hialurónico-carnosina (carga 7%) en comparación con la del ácido hialurónico no conjugado: más específicamente, la gráfica se obtuvo para una solución (0,5 mg/ml) de HyCar (7% de carga) en comparación con una solución, a la misma concentración del ácido hialurónico no conjugado correspondiente.

Los resultados mostraban que la viscosidad intrínseca del conjugado de HyCar solo es ligeramente inferior que la del ácido hialurónico no conjugado que tiene el mismo PM, mientras que el peso molecular medio en peso del conjugado es coherentemente mayor que el del polisacárido original. Esto significa que la conjugación no altera las características fisicoquímicas del HA, de las que depende su comportamiento reológico. Esto es muy importante especialmente en la fase de formulación del producto, cuando es necesario establecer a priori los parámetros reológicos del producto acabado (viscosidad, suavidad, etc.).

Actividad antioxidante de tipo SOD

La actividad de tipo SOD del complejo con Cu(II) del conjugado HyCar se determinó usando el método indirecto de Fridovich (Anal. Biochem. 44, 276, 1971). El anión superóxido se generó enzimáticamente mediante el sistema xantina-xantina oxidasa y espectrofotométricamente seguido por comprobación de la reducción de nitroazul tetrazolio (NBT) a 560 nm.

La mezcla de reacción contenía: citocromo c (30 μ M) o NBT (250 μ M), xantina (50 μ M), en un tampón de fosfato (10 mM) a pH 7,4. Se añadió una cantidad apropiada de xantina-oxidasa a 2 ml de esta mezcla a fin de producir un ΔA min⁻¹ de 0,024. Esto corresponde a una velocidad de producción de O₂⁻ igual a 1,1 μ M min⁻¹. La velocidad de reducción de la molécula cromogénica se midió en presencia y en ausencia del complejo bajo examen durante 600 segundos. Todas las medidas se efectuaron a 25±0,2°C usando cubetas que tenían un camino óptico de 1 cm, reguladas termostáticamente y equipadas con agitación magnética. A fin de excluir una posible inhibición de la actividad de xantina-oxidasa, la producción de ácido úrico en la parte de xantina oxidasa se siguió espectrofotométricamente a 295 nm, en experimentos separados.

Los valores de I₅₀ (es decir, la concentración que produce una inhibición de 50% de la reducción de NBT) de los complejos metálicos bajo examen, determinados a pH 7,4, se indican en la Figura 4 y en la Tabla 2 posteriormente.

Tabla 2

Complejo	$I_{50} \mu M$
SOD	0,014 ($\pm 0,003$)
Cu/HyCar (7%)	0,21 ($\pm 0,04$)
Cu/Car	0,8($\pm 0,16$)
Cu/ HA	1,0($\pm 0,2$)

Por lo tanto, la Tabla 2 indica las actividades de tipo SOD de los complejos con Cu(II) de HyCar, Car y HA, expresadas como concentraciones capaces de inhibir 50% de la reducción de NBT (I_{50}) .

- 5 Más específicamente, la Figura 4 indica las actividades de tipo SOD de los complejos con Cu(II) de (Cu-HyCar) y HA no conjugado (Cu-HA), determinadas por medio del método indirecto propuesto por Fridovich según las especificaciones operativas descritas anteriormente. Claramente, cuanto menor sea la cantidad de producto usada para obtener el valor de I_{50} , mayor es su actividad antioxidante. A partir del análisis de los datos, parece evidente que el conjugado Cu/Hycar tiene una actividad antioxidante aproximadamente 4 veces superior que la de Cu/Car. Dado
- 10 que el complejo Cu/HA, según se esperaba, tiene una actividad antioxidante muy baja, el resultado obtenido con Cu/Hycar es sorprendente e inesperado, y demuestra la sinergia debida al tipo particular de conjugación HA/carnosina a través del enlace amida, según se describe aquí.

Hidrólisis enzimática en la parte de carnosinasa sérica humana

- 15 La estabilidad dependiente del tiempo de HyCar con respecto a carnosinasa sérica humana, en comparación con la estabilidad de la mezcla de carnosina + HA o carnosina sola, se determinó al incubar cada una de estas sustancias (900 μM) a 37°C en Tris/HCl 50 mM (pH 8,0) con la enzima mencionada anteriormente (CN1), purificada mediante el medio de cultivo de células Hela transfectadas establemente según se indica previamente (Antioxid. Redox Signal., 11, 2759, 2009). Se efectuó un experimento paralelo como control negativo, en el que ácido hialurónico solo se sometió a reacción enzimática. El transcurso de la reacción se siguió al recoger, a diversos intervalos de tiempo, partes
- 20 alícuotas de 50 μl de la mezcla durante un total de 5 horas, y, después de la desproteinización con ácido tricloroacético (TCA), determinar fluorométricamente la cantidad de histidina en la solución final, después de la reacción con aldehído orto-ftálico (OPA; Fluka), según un procedimiento ya descrito (Clin. Chim. Acta, 1982, 123, 221). Los resultados se indican en la Figura 5.

- 25 Más específicamente, la Figura 5 indica la estabilidad con el tiempo de HyCar (●), sometido a la acción de carnosinasa sérica humana, en comparación con la estabilidad de carnosina (■), carnosina + HA (▲) y HA solo (◆) (el último usado como control negativo del experimento). La histidina liberada se determinó espectrofotométricamente como derivado de OPA.

Hidrólisis enzimática en la parte de hialuronidasa testicular bovina

- 30 La estabilidad del conjugado HyCar con respecto a hialuronidasa (hialuronidasa testicular bovina, Sigma) se evaluó al incubar el mismo (250 μl , 20 mg/ml) durante 2 h a 37°C en un tampón (acetato sódico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 5,2) con 1.500 unidades de enzima. Después de este período, el hidrolizado se analizó en HPLC en una columna de intercambio aniónico bajo las condiciones experimentales descritas bajo el punto [0024] y citadas previamente en la bibliografía (Anal. Chem., 2007, 6390-6397). En un experimento paralelo, se usó ácido hialurónico libre como sustrato para la misma enzima bajo las mismas condiciones experimentales. En ambos casos, se obtuvo un perfil
- 35 cromatográfico similar, caracterizado por la presencia de productos de degradación que consisten esencialmente en unidades glucídicas tetrámeras y hexámeras.

Referencias bibliográficas citadas en la descripción

La siguiente lista indica las referencias bibliográficas mencionadas por el Solicitante, producida solamente para la comodidad del lector. No se debe considerar que la misma sea parte del documento de patente. Aunque se haya preparado con el máximo cuidado, no se pueden excluir posibles errores u omisiones. Por lo tanto, no se asume responsabilidad a este respecto.

Patentes citadas en la descripción:

- US 4508728 A;
- DE 4316293;
- WO 0152808 A;
- WO 9510294 A;
- EP 1176154 A;
- EP 1860116 A1;
- WO 2012/076961 A2;

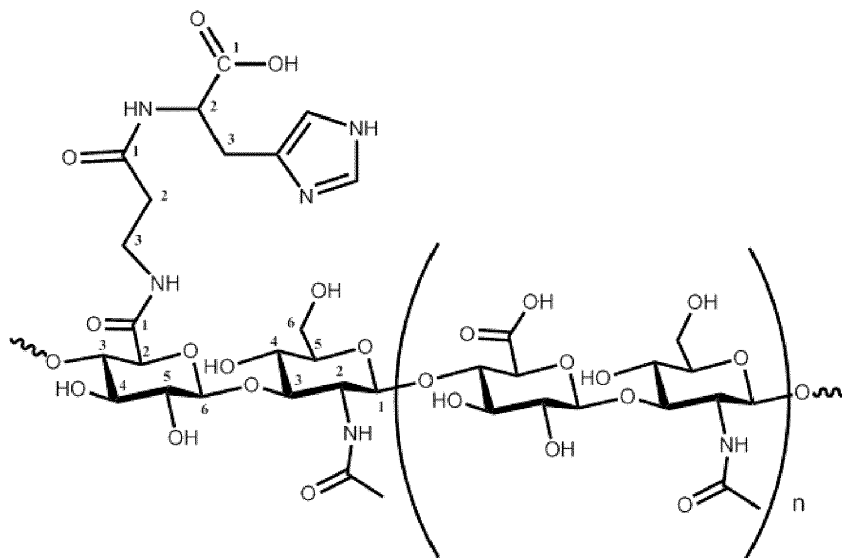
Bibliografía no relacionada con las patentes mencionada en la descripción:

- Biochim. Biophys. Acta, 2002, vol. 1570, 89;
- Molecules and Cells, 2002, vol. 13, 498;
- Biochem. J., 1988, vol. 967, 241;
- Biochem. Int., 1987, vol. 15, 1105;
- Biochim. Biophys. Acta, 1989, vol. 1004, 363;
- Eur. J. Med. Chem., 2008, vol. 43, 373;
- Helv. Chim. Acta, 2002, vol. 85, 1633;
- J. Neurosci. Res. 2007, vol. 85, 2239;
- Neurochem. Res., 2010, vol. 35, 2144;
- Mol. Aspects Med., 2011, vol. 32, 258;
- Neurochem. Res., 2013, vol. 38, 50;
- Dalton Trans., 2003, 4406;
- Biomed. Res. Trace Elem., 2001, vol. 12, 159;
- Clinical Chim. Acta, 1996, vol. 254, 1;
- J. Am. Chem. Soc., 1998, vol. 120, 7030;
- Biomedical applications of hyaluronic acid. ACS Publications, 2006, p. 155-74;
- Biomaterials, 2004, vol. 25, 1339;

- Calcified Tissue Int., 1971, vol. 7, 175;
- Dumitriu S., Polymeric biomaterials. Nueva York: Marcel Dekker, 2002. ISBN: 0-8247-8969-5;
- Garg H.G., Hales C.A., Chemistry and biology of hyaluronan. Oxford: Elsevier Science, 2004. ISBN: 978-0-08-044382-9;
- 5 • Biomaterials, 2005, vol. 26, 359;
- Nat. Rev. Cancer, 2004, vol.4, 528;
- J. Surg. Res., 2008, vol. 147, 247;
- J. Cell Sci., 1992, vol. 103, 293;
- Vet. Med., 2008, vol. 53, 397;
- 10 • Acta Biomater., 2010, vol. 6, 2407;
- Biomaterials, 2007, vol. 28, 1830;
- J. Control. Release, 2000, vol. 69, 169;
- Chem. Rev., 2001, vol. 101, 1869;
- Biomaterials, 2003, vol. 24, 4337;
- 15 • Int. J. Tissue React., 2002, vol. 24, 65;
- Acta Biomater., 2013, vol. 9, 7081 ;
- Anal. Biochem., 1971, vol. 44, 276;
- Clin. Chim. Acta, 1982, vol. 123, 221;
- Anal. Chem., 2007, 6390-6397;
- 20 • Free Rad Res. Commun., 1991, 12-13 pt.1, 179-185.

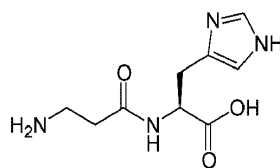
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula (1)



(1)

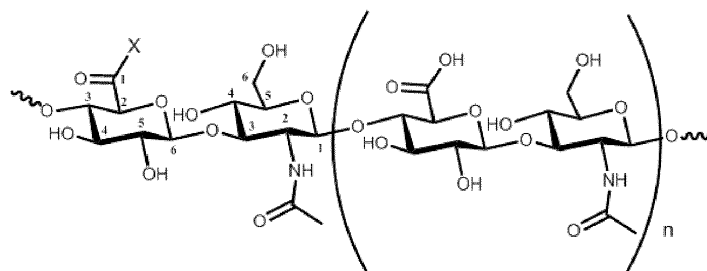
conjugado de dipéptido de carnosina que tiene la fórmula (2)



(2)

5

con ácido hialurónico, en donde la conjugación se efectúa mediante la formación de un enlace amida entre el grupo NH_2 de la carnosina, preferiblemente protegida en el grupo carboxilo, y uno o más grupos carboxílicos de ácido hialurónico, preferiblemente de un derivado activo de ácido hialurónico, aún más preferiblemente un éster de COX que tiene la fórmula (3)



(3).

10

2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que el porcentaje de los grupos carboxílicos de ácido hialurónico conjugados mediante la formación de un enlace amida con carnosina varía de 2 a 25%, preferiblemente de 5 a 20%, y es preferiblemente igual a 7%.

15

3. El compuesto según una o más de las reivindicaciones previas, en el que el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio en peso que varía entre 90 y 230 kDa, preferiblemente entre 180 y 210 kDa.

4. El compuesto según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio en peso que varía entre 500 y 730 kDa.

5. El compuesto según una o más de las reivindicaciones previas, en el que el compuesto que tiene la fórmula (1) está en la forma de un complejo de Cu(II).
6. Un procedimiento para la preparación del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado por que un derivado activo de ácido hialurónico se conjuga covalentemente con una carnosina, preferiblemente protegida en el grupo carboxilo, desprotegiéndose dicho grupo carboxilo de la carnosina, cuando está protegido, al final de la reacción de conjugación.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el derivado activo de ácido hialurónico es un éster, y es preferiblemente el éster de 3-hidroxi-1,2,3,-benzotriacín-4(H)-ona.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en el que la carnosina se protege en el grupo carboxilo mediante la formación de un éster metílico.
9. Composiciones farmacéuticas, cosméticas o nutracéuticas que comprenden, como principio activo, el compuesto que tiene la fórmula (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
10. Composiciones farmacéuticas, cosméticas o nutracéuticas que comprenden, como principio activo, el compuesto que tiene la fórmula (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para el uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos y afecciones de la conformación de proteínas tales como cataratas, ojo seco, envejecimiento de la piel, heridas, lesiones gástricas, diabetes, respuesta inmunitaria deteriorada, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, enfermedades tumorales y neurológicas, daño debido a isquemia/reperfusión.

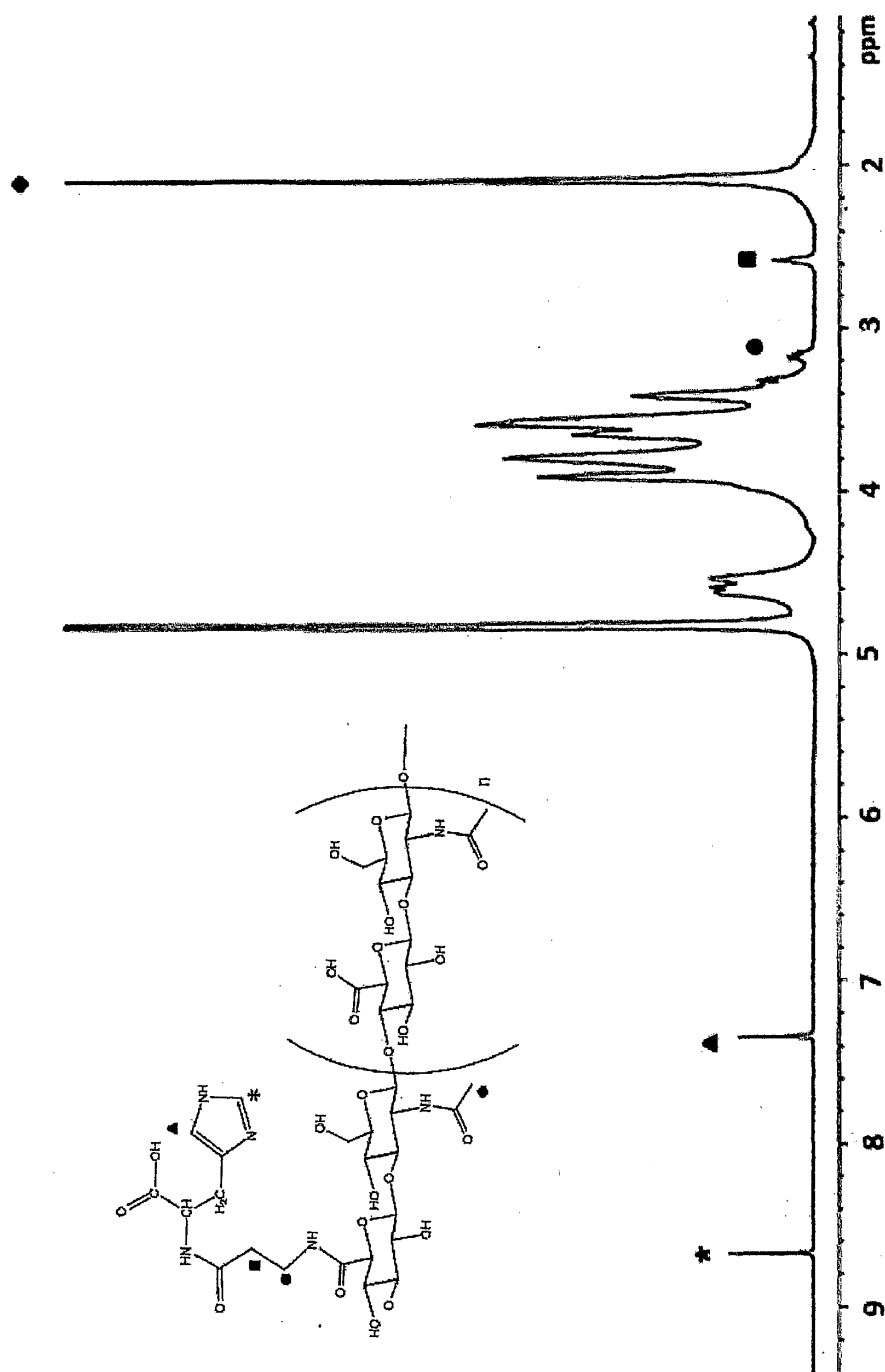


Fig. 1

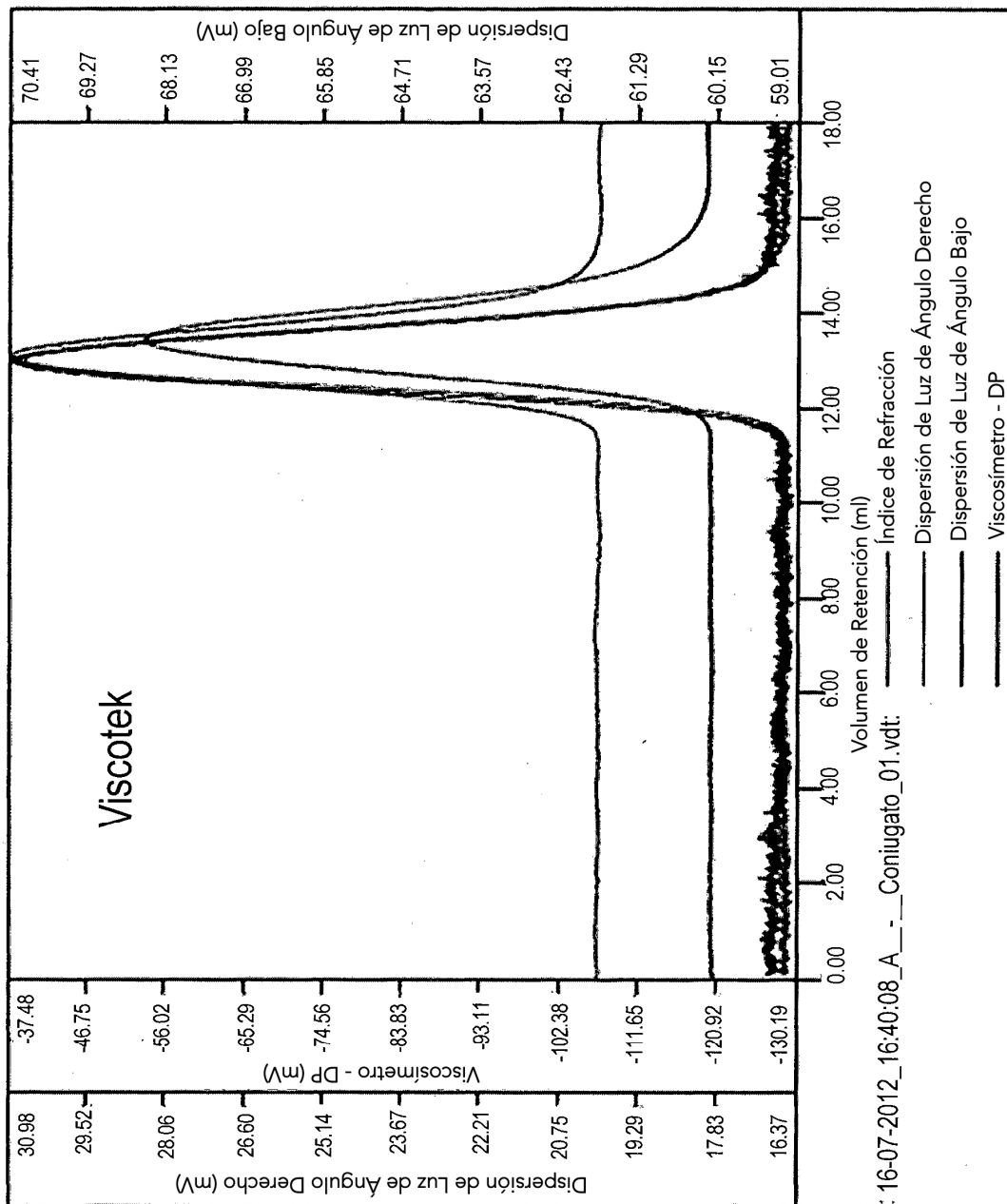


Fig. 2

Gráfica Superpuesta Logaritmo Viscosidad Intrínseca Frente a Logaritmo Peso Molecular

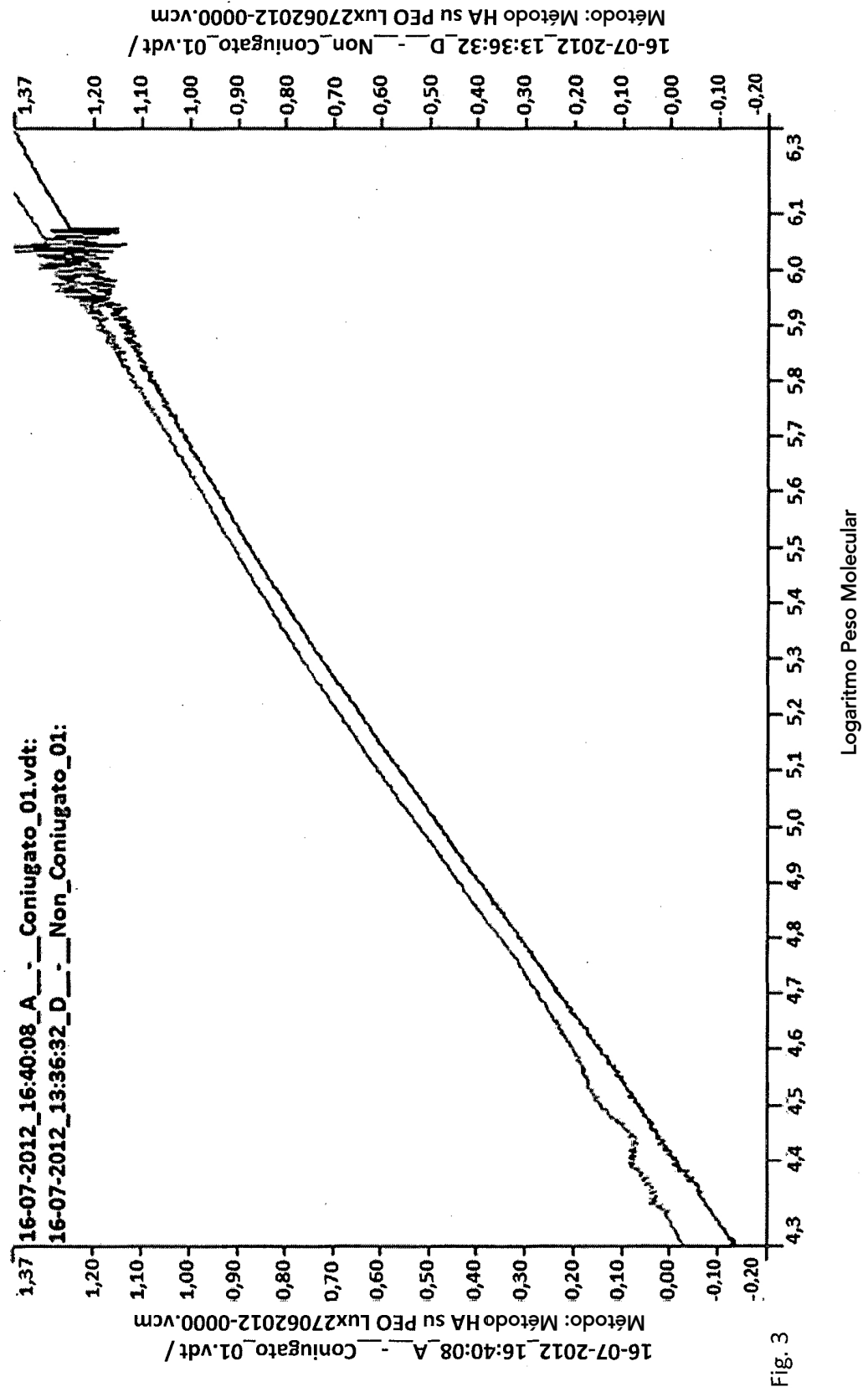
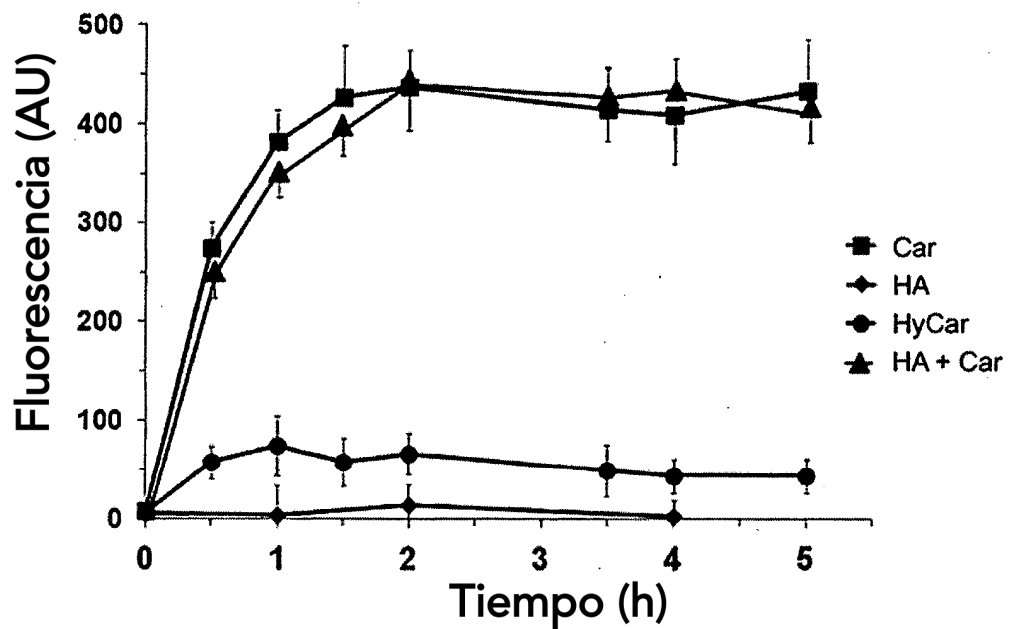
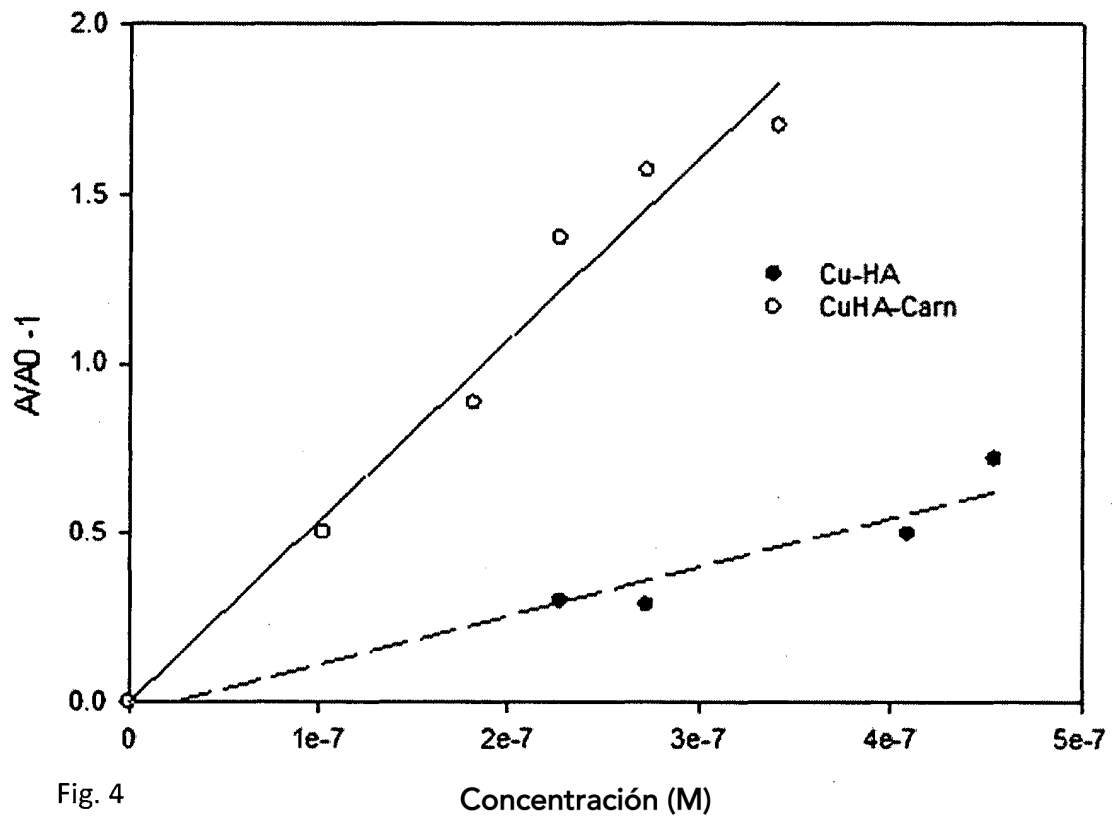


Fig. 3



Estabilidad de HyCar con el tiempo (●); Carnosina (■), Carnosina + HA (▲) y HA solo (◆).