(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 326 721**

(21) Número de solicitud: 200800011

(51) Int. Cl.:
***C08B 37/00*** (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **04.01.2008**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2009**

Fecha de la concesión: **05.07.2010**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **16.07.2010**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **16.07.2010**

(73) Titular/es: **ENDOR NANOTECHNOLOGIES, S.L.**
**Campus de la UAB, Edificio Q - 3ª Pl.**
**08193 Bellaterra, Barcelona, ES**

(72) Inventor/es: **Ramis Castelltort, Marc;**
**Ojea Jiménez, Isaac y**
**Querol Sastre, Joaquín**

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

(54) Título: **Conjugado de ácido hialurónico para el tratamiento cosmético y procedimiento de preparación.**

(57) Resumen:
Conjugado de ácido hialurónico para el tratamiento cosmético y procedimiento de preparación.
La presente invención describe un nuevo compuesto conjugado que comprende al menos un oligómero de HA derivatizado a través de un linker tiolado, por el que se une a al menos una nanopartícula metálica, como por ejemplo una nanopartícula de oro. Asimismo, se describen procedimientos para su obtención, así como su uso en un tratamiento cosmético, y composiciones cosméticas que los contienen.

ES 2 326 721 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

## DESCRIPCIÓN

Conjugado de ácido hialurónico para el tratamiento cosmético y procedimiento de preparación.

### Campo de la invención

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

### Antecedentes de la invención

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

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

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

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

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

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

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

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

### Breve descripción de las figuras

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Objeto de la invención**

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

- al menos una nanopartícula metálica; y

- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un linker que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica,

con la condición de que cuando el oligómero de HA presenta un número de monómeros n, siendo n > 1000, y la nanopartícula es de oro con un tamaño de 20 nm, el linker es distinto de $H_2N$-$CH_2$-$CH_2$-SH.

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

Un objeto adicional se refiere a un compuesto conjugado obtenible mediante uno de los procedimientos de síntesis de la presente invención.

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

- al menos una nanopartícula metálica; y

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

- al menos, una molécula conjugada a, al menos, una nanopartícula metálica.

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

Un compuesto conjugado que comprende:

- al menos una nanopartícula metálica; y

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

Un compuesto multiconjugado de la invención, junto con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

Otro objeto adicional se refiere al empleo de al menos un compuesto seleccionado entre:

Un compuesto conjugado que comprende:

- al menos una nanopartícula metálica; y

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

Un compuesto multiconjugado de la invención, en la elaboración de una composición cosmética para su aplicación tópica o para su aplicación mediante inyección en la piel.

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

**Descripción de la invención**

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

- al menos una nanopartícula metálica; y

- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un linker que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica,

con la condición de que cuando el oligómero de HA presenta un número de monómeros n, siendo n > 1000, y la nanopartícula es de oro con un tamaño de 20 nm, el linker es distinto de $H_2N$-$CH_2$-$CH_2$-SH.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La nanopartícula metálica del compuesto conjugado puede seleccionarse de entre el grupo formado por nanopartículas y partículas núcleo-coraza. La nanopartícula, el núcleo y la coraza pueden estar independientemente constituidos por un material seleccionado del grupo formado por los metales Au, Ag, Pt, Co, Fe, los óxidos derivados de uno cualquiera de los metales anteriores y $TiO_2$. En una realización preferente la nanopartícula es de oro. Tanto las nanopartículas de oro como las partículas núcleo-coraza de oro presentan una superficie muy versátil para funcionalizarla con diversos tipos de biomoléculas como el HA. Se trata de un elemento noble y muy poco reactivo en medios biológicos.

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

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

En el compuesto conjugado el oligómero de HA se encuentra derivatizado con, al menos, un linker y a través de, al menos, un enlace químico covalente que se selecciona de entre un enlace amida, éster y éter en función del grupo funcional del HA que se hace reaccionar en la reacción de derivatización y de la fórmula del linker que se utiliza. En este sentido, en una realización particular de la invención, el enlace es amida -CONH-, formado en-

tre un grupo ácido libre de un mer (ácido glucurónico) de HA y un linker de fórmula general $H_2N$-$R_1$-S-$R_2$ en el que:

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

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

En una realización preferida, en el linker de fórmula general $H_2N$-$R_1$-S-$R_2$

$R_2$ representa un grupo seleccionado de entre H, -$CH_3$, -$CH_2$-$CH_3$ y -$CH_2$-CH=$CH_2$ y

$R_1$ representa un grupo seleccionado de entre -(CH)(COOH)$(CH_2)_n$- donde n es 1 ó 2.

En una realización más preferida el linker es tiopropionilhidrazida y presenta la fórmula $NH_2$-NH-CO-$(CH_2)_n$-SH, donde n es 2. En particular, el oligómero de HA ya derivatizado con este linker, se puede obtener de forma comercial (Glycosil™, Glycosan Biosystems Inc.) para su posterior empleo en la obtención de un compuesto conjugado según algunos de los procedimientos de la presente invención que se describen más abajo.

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

a) a través de, al menos, un enlace químico éster -COO-, formado entre un grupo ácido carboxílico de un mer (ácido glucurónico) de HA y un linker de fórmula general HO-$R_1$-S-$R_2$, ó

b) a través de, al menos, un enlace químico éter, -O- formado entre un grupo -OH del oligómero de HA y un linker de fórmula general GS-$R_1$-S-$R_2$,

donde

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

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

GS representa un grupo saliente.

En una realización preferente, en las fórmulas generales HO-$R_1$-S-$R_2$ y GS-$R_1$-S-$R_2$

$R_2$ representa un grupo seleccionado de entre H, -$CH_3$, -$CH_2$-$CH_3$ y -$CH_2$-CH=$CH_2$ y

$R_1$ representa un grupo -$(CH_2)_n$- donde n es un valor comprendido entre 1 y 20.

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

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

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

La imagen de TEM muestra que las nanopartículas de oro se concentran en grupos separados y dispersos. En la Figura 7, se muestra el Espectro UV-Vis de las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato sódico, y como la conjugación de los oligómeros de HA derivatizado a ellas, induce a un desplazamiento del pico de absorción a una longitud de onda mayor, en este caso a 522 nm con respecto al de las nanopartículas de oro sin conjugar (519 nm). La Figura 8 muestra el potencial Z donde se observa que la conjugación de los oligómeros de HA derivatizado induce a un desplazamiento del pico de potencial Z a -19.1 mV con respecto al pico de -50.8 mV correspondiente a las nanopartículas de oro no conjugadas.

Como se mencionó anteriormente de acuerdo a una realización particular el compuesto conjugado es el que presenta una estructura general como la que se representa en la Figura 5. En un caso más particular el compuesto conjugado

comprende nanopartículas de oro de 8 nm aproximadamente, y un oligómero de HA derivatizado, cuya fórmula se muestra en la Figura 9, "tiopropionilhidrazida-HA". Este compuesto conjugado se obtiene de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 y ha sido caracterizado.

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

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

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

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

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

- al menos una nanopartícula metálica; y

- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un linker que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica,

con la condición de que cuando el oligómero de HA presenta un número de monómeros n, siendo n > 1000, y la nanopartícula es de oro con un tamaño de 20 nm, el linker es distinto de $H_2N$-$CH_2$-$CH_2$-SH.

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

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

Los distintos procedimientos se describen a continuación:

El Procedimiento A) comprende las siguientes etapas:

(i) hidrólisis enzimática de un polímero de HA;

(ii) obtención de los fragmentos oligómeros de HA;

(iii) derivatización de los fragmentos oligómeros de HA por reacción química con un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter; y

(iv) conjugación de al menos un fragmento oligómero de HA derivatizado obtenido en la etapa anterior a al menos una nanopartícula metálica.

El Procedimiento B) comprende las siguientes etapas:

(i) derivatización de un polímero de HA por reacción química con un linker que comprende un grupo -S- por formación de al menos un enlace químico amida, éster o éter;

(ii) hidrólisis enzimática del polímero de HA derivatizado;

(iii) obtención de fragmentos oligómeros de HA derivatizados; y

(iv) conjugación de al menos uno de los fragmentos obtenidos en la etapa anterior con al menos una nanopartícula metálica.

El Procedimiento C) comprende las siguientes etapas:

(i) derivatización de un polímero de HA por reacción química con un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter; y

(ii) conjugación del polímero de HA derivatizado obtenido en la etapa anterior a al menos una nanopartícula metálica;

(iii) hidrólisis enzimática del polímero de HA derivatizado;

(iv) obtención del compuesto conjugado.

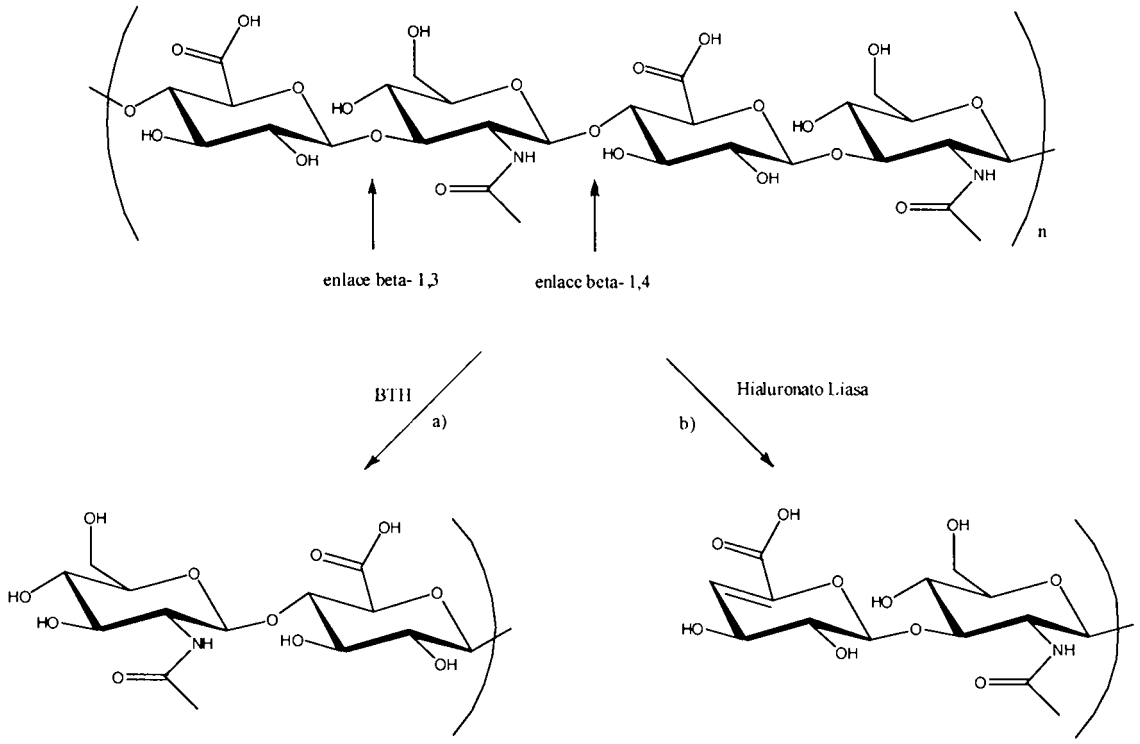
De acuerdo al Procedimiento A, la etapa (ii) consiste en la hidrólisis enzimática de un polímero de HA. El polímero de HA de partida, se obtiene de forma comercial como se ha mencionado anteriormente. El polímero de HA comprende a su vez oligómeros de diferente número de mers de HA, los cuales se hidrolizan para dar fragmentos oligosacáridos (fragmentos oligómeros) de menor tamaño y estructura variable mediante la acción de dos tipos de enzimas posibles a) y b), tal y como se representa en el Esquema 1:

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

b) Hidrólisis con una hialuronato liasa (E.C. 4.2.2.1). La hidrólisis se produce en los enlaces $\beta$-1-4 y se obtienen oligosacáridos con un ácido urónico $\Delta^4$-insaturado del extremo hidrolizado para dar oligosacáridos de estructuras L-4dthrHex4enA-(1→3)-[D-GlcNAc-(1→4)-D-GlcA]$_n$-(1→3)-D-GlcNAc (ver Ponnuraj, K. and M. J. Jedrzejas (2000), "Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 A resolution". J Mol Biol 299(4): 885-95).

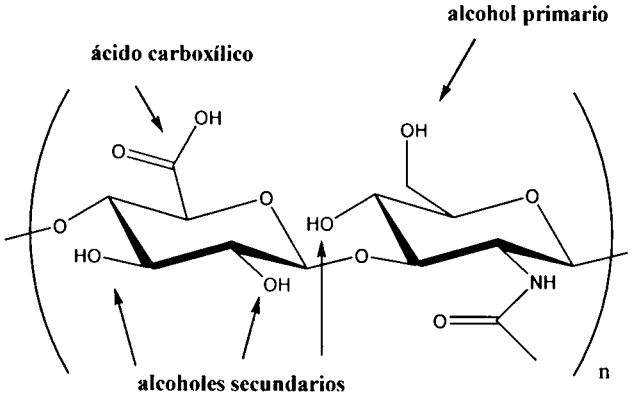
(Esquema pasa a página siguiente)

Esquema 1




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

Esquema 2




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

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

$$H_2N\text{-}R_1\text{-}S\text{-}R_2$$

donde

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

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

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

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

$$HO-R_1-S-R_2$$

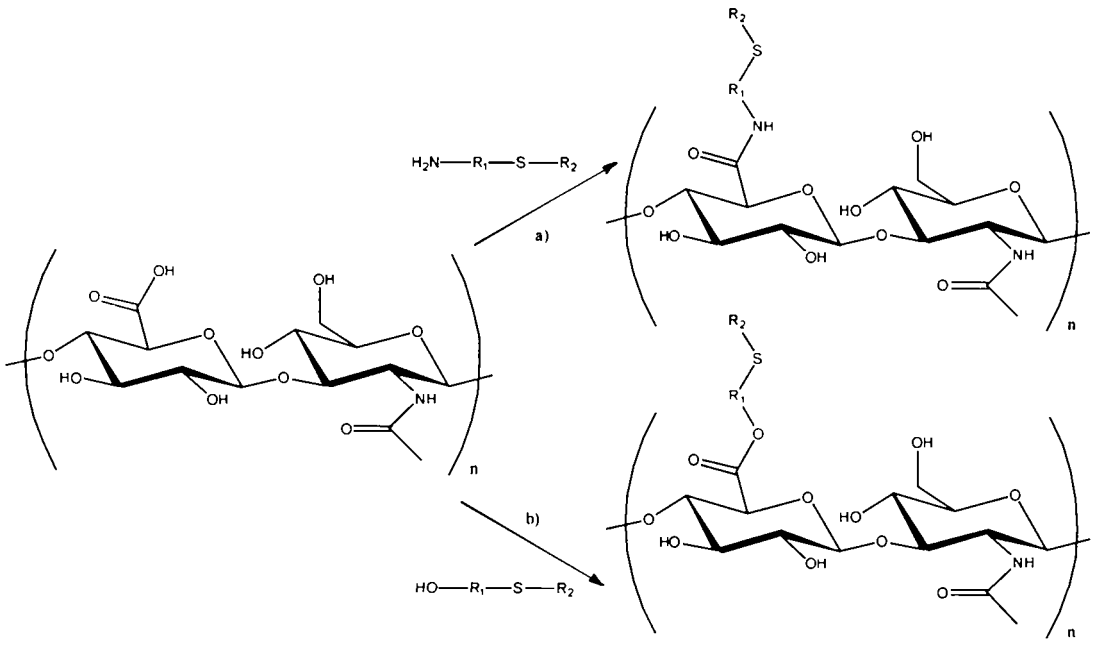
donde

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

$R_1$ representa un grupo seleccionado de entre $-(CH)_n-$, $-(CH)(COOH)(CH_2)_n-$, donde n es un valor comprendido entre 1 y 20;

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

Esquema 3




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

$$GS-R_1-S-R_2,$$

donde

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

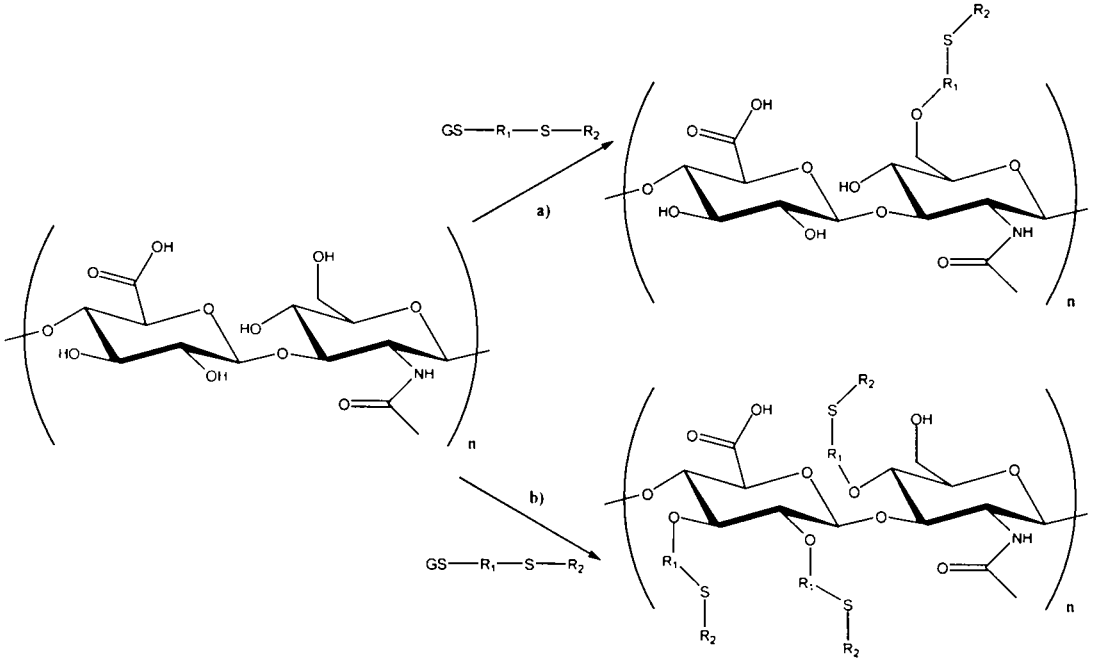
$R_1$ representa un grupo seleccionado de entre $-(CH)_n-$, $-(CH)(COOH)(CH_2)_n-$, donde n representa un número entero comprendido entre 1 y 20; y

GS representa un grupo saliente

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

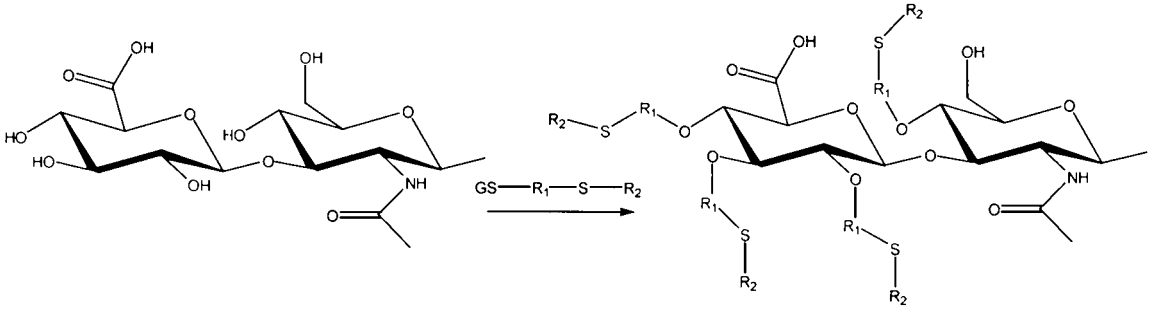
Variando las condiciones de reacción como la proporción de los reactivos, cantidad y/o tipo de disolvente, pH, temperatura y el tiempo de reacción, se controla la funcionalización mayoritaria del alcohol primario frente a los secundarios y la cantidad de mono-, di- o tri-substitución de los alcoholes secundarios.

Esquema 4




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

Esquema 5




En la etapa (iv) del procedimiento A, se conjuga al menos uno de los fragmentos oligómeros de HA derivatizados, a, al menos, una nanopartícula metálica. Para la reacción de conjugación una disolución acuosa con una concentración generalmente entorno a $10^{12}$ nanopartículas metálicas por mililitro, se agita típicamente en presencia de un gran exceso del oligómero de HA derivatizado en cuestión, a temperatura ambiente durante 1 hora. La proporción de oligómero de HA respecto a la concentración de nanopartículas metálicas se calcula de la siguiente forma: a) se calcula el número de átomos metálicos que hay en la superficie de una esfera, mediante el cálculo teórico del área superficial de la misma, y asumiendo que cada átomo ocupa 1-2 $nm^2$. Se asume que cada átomo de azufre del linker se conjuga con un solo átomo de la nanopartícula metálica. Teniendo en cuenta el número de nanopartículas metálicas en disolución se añade un exceso de 100 veces más de oligómero de HA derivatizado.

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

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

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

(i) hidrólisis enzimática de un polímero de HA derivatizado con un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter;

(ii) obtención de los fragmentos oligómeros de HA derivatizados; y

(iii) conjugación de al menos un fragmento oligómero de HA derivatizado obtenido en la etapa anterior a al menos una nanopartícula metálica.

El procedimiento E) para la preparación de un compuesto conjugado comprende:

(i) conjugación de un polímero de HA derivatizado con un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter a al menos una nanopartícula metálica;

(ii) hidrólisis enzimática del producto resultante de la etapa anterior; y

(iii) obtención del compuesto conjugado.

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

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

Según una realización particular, los oligómeros biosintetizados de HA de hasta 1000 kDa, se derivatizan a través del grupo -OH de la posición 3 o 4 del sacárido inicial o final del oligómero con un linker de fórmula general GS-$R_1$-S-$R_2$.

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

- al menos una nanopartícula metálica; y

- al menos un polímero u oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un linker que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica,

con la condición de que cuando el polímero u oligómero de HA presenta un número de monómeros n, siendo n > 1000, y la nanopartícula es de oro con un tamaño de 20 nm, el linker es distinto de $H_2N$-$CH_2$-$CH_2$-SH.

El Procedimiento G comprende las siguientes etapas:

(i) partir de un polímero u oligómero de HA,

(ii) derivatizarlo con al menos un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter;

(iii) conjugar un polímero u oligómero de HA derivatizado a una o más nanopartículas metálicas, y

(iv) obtención del compuesto conjugado.

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

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

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

En otro aspecto adicional la invención se relaciona con un compuesto multiconjugado, en adelante compuesto multiconjugado de la invención, que comprende:

- al menos una nanopartícula metálica; y

- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un linker que comprende un grupo -S- por el que se une la molécula de HA derivatizada a la nanopartícula metálica, y

- al menos, una molécula conjugada a, al menos, una nanopartícula metálica.

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

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

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

un compuesto conjugado que comprende:

- al menos una nanopartícula metálica; y

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

un compuesto multiconjugado de la invención,

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

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

un compuesto conjugado que comprende:

- al menos una nanopartícula metálica; y

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

un compuesto multiconjugado de la invención,

en la elaboración de una composición cosmética, en particular para su aplicación tópica o mediante inyección en la piel.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Ejemplos**

Ejemplo 1

*Obtención de un compuesto conjugado*

Ejemplo 1.1

*Síntesis de nanopartículas de oro*

Una disolución acuosa (150 mL) de citrato de sodio (2.2 mM) se calentó a ebullición con agitación vigorosa. El siguiente paso fue añadir 1mL de una disolución acuosa (23.4 mM) de $HAuCl_4$ sobre la disolución a ebullición. La reducción tuvo lugar en aproximadamente 2 minutos y se formó una disolución de nanopartículas de oro, la cual experimentó un cambio de color indicativo de violáceo a rojo intenso. Finalmente se separó el reactor de la fuente de calor y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Las nanopartículas de oro así obtenidas se caracterizaron mediante UV-Vis. El tamaño medio de 8 nm de las nanopartículas de oro se determinó mediante tratamiento informático de las imágenes obtenidas por TEM, asimismo se midió el diámetro de una muestra aleatoria de nanopartículas y se realizó la distribución Gaussiana de tamaños.

Ejemplo 1.2

*Funcionalización de nanopartículas de oro con oligómero 6-mer de HA derivatizado*

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

Tiopropionilhidrazida-HA (Glycosil™, Glycosan Biosystems Inc.) se despolimerizó mediante la acción del enzima hialuronato 4-glucanohidrolasa ("Bovine Testicular Hyaluronidase" (BTH)) (E.C. 3.2.1.35) (Hyaluronidase Type I-S, Sigma-Aldrich). A una solución que contenía 5 mg de oligómeros de tiopropionilhidrazida-HA en 25 mL de disolución tampón acuosa (100 mM fosfato de sodio, 150 mM cloruro de sodio, pH 5.3) se le añadieron $5*10^4$ U de BTH y se dejó incubar durante 40 horas a 37ºC. La reacción enzimática se detuvo mediante la ebullición de la muestra durante 20 min. (Glycobiology, 2002 Jul;12(7):421-6).

1.2.2 *Purificación de los oligómeros de HA derivatizados*

La mezcla de oligómeros de HA-derivatizado se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min y el sobrenadante se concentró y liofilizó. A continuación, la muestra liofilizada se reconstituyó en agua destilada.(Glycobiology, 2002 Jul;12(7):421-6).

Ejemplo 1.3

*Conjugación de nanopartículas de oro a oligómeros 6-mer de HA derivatizado*

Las nanopartículas de oro de 8 nm obtenidas según el Ejemplo 1.1, se funcionalizaron con los oligómeros derivatizados (tiopropionilhidrazida-HA, MW 1455 g/mol) obtenidos en la etapa anterior, mediante la adición de 100 $\mu$l de una disolución 1.5 mM de oligómero derivatizado por 5 mL de disolución de nanopartículas de oro. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación magnética durante 30 minutos. La reacción se paró disminuyendo la temperatura (dentro de la nevera). La purificación se hizo por diálisis (molecular weight cut off (MWCO) 16 mm) contra citrato de sodio (2.3 mM, 3,25 g/5L $H_2O$). Se obtuvo el compuesto conjugado.

Ejemplo 1.4

*Caracterización del compuesto conjugado obtenido*

1.4.1 *Espectro de UV-Vis*

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

1.4.2 *Visualización del compuesto conjugado mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)*

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

1.4.3 *Espectro de Potencial Z del compuesto conjugado*

Se determinó el potencial-Z del compuesto conjugado. La conjugación a una nanopartícula de los oligómeros de HA derivatizado induce a un desplazamiento del pico de potencial Z a -19.1 mV como se muestra en la Figura 8 con respecto al pico de -50.8 mV correspondiente a las nanopartículas de oro no conjugadas.

Ejemplo 2

*Obtención de un compuesto conjugado*

Ejemplo 2.1

*Funcionalización de nanopartículas de oro con oligómeros de HA*

2.1.1 *Hidrólisis enzimática de un polímero de HA*

El polímero de HA (HA, sal de sodio, de Streptococcus eq., Sigma-Aldrich) se despolimerizó mediante la acción del enzima ("Bovine Testicular Hyaluronidase (BTH)") hialuronato 4-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.35) (Hyaluronidase Type I-S, Sigma-Aldrich). A una solución que contenía 5 mg de HA en 25 mL de disolución tampón acuosa (100 mM fosfato de sodio, 150 mM cloruro de sodio, pH 5.3) se le añadieron $5*10^4$ U de BTH y se agitó durante 40 horas a 37ºC. La reacción enzimática se detuvo mediante la ebullición de la muestra durante 20 minutos. (Glycobiology, 2002 Jul;12(7):421-6).

2.1.2 *Purificación de los oligómeros de HA*

La mezcla de fragmentos oligómeros de HA se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se concentró y liofilizó. A continuación, los oligómeros de HA se purificaron mediante tubos de centrifugación Centricon Plus 20 con un corte de peso molecular de 10 kDa. Finalmente, se obtuvo una mezcla de oligómeros de HA de tamaños comprendidos entre 4 y 52-mer (Glycobiology, 2002 Jul;12(7):421-6) que fue utilizada en la etapa siguiente.

2.1.3 *Derivatización de los oligómeros de HA*

Los grupos carboxilo (-COOH) libres del ácido glucurónico presentes a lo largo de la cadena se derivatizaron con un "linker" mediante la formación de un enlace amida empleando el método de la carbodiimida. Los oligómeros (20 g, 50 mmol) se disolvieron en agua (2 L) y se ajustó el pH a 4.8 con HCl 1.0 N. Los grupos ácidos se activaron químicamente mediante la adición de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)(100 mmol). A continuación, se añadió una cantidad del linker ditiobis(propanodihidrazina) $NH_2$-NH-CO-$(CH_2)_2$-S-S-$(CH_2)_2$-CO-NH-$NH_2$ (100 mmol) en una proporción 1:2 oligómero: linker, respectivamente, y se volvió a reajustar el pH al mismo nivel que anteriormente. La mezcla de la reacción se incubó a temperatura ambiente durante un período de 12 horas. La reacción se paró mediante la adición de NaOH 1.0 N aumentando el pH hasta 7. A continuación se añadió ditiotreitol (650 mg) y se aumentó el pH hasta 8 mediante la adición de NaOH 1.0 N. La reacción se agitó durante 24 horas y luego se acidificó a pH 3.5 con HCl 1.0.

La mezcla de la reacción resultante se dializó exhaustivamente con una membrana de diálisis de corte de peso molecular de 3,5 kDa contra HCl diluido (pH = 3.5) conteniendo 1% de NaCl, y finalmente contra agua destilada y desmineralizada. Se obtuvo una mezcla de oligómeros entre 4 y 52-mer de HA derivatizados.

2.1.4 *Conjugación de nanopartículas de oro a oligómeros de HA derivatizados*

Las nanopartículas de oro de 8 nm obtenidas en el Ejemplo 1.1 se conjugaron con los oligómeros derivatizados obtenidos en 2.1.3, mediante la adición de 100 $\mu$l de una disolución 1.5 mM de oligómeros derivatizados por 5 mL de disolución de nanopartículas. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación magnética durante 30 minutos. La reacción se paró disminuyendo la temperatura a 4ºC. La purificación se hizo por diálisis (MWCO 16 mm) contra citrato de sodio (2.3 mM, 3,25 g/5L $H_2O$).

Ejemplo 3

*Obtención de un compuesto conjugado*

Ejemplo 3.1

*Conjugación de nanopartículas de oro a un polímero de HA derivatizado*

Las nanopartículas de oro de 8 nm se conjugaron con un polímero de HA derivatizado, mediante la adición de 100 $\mu$l de una disolución 1.5 mM de *thiopropionylhydrazide-HA* (Glycosil TM) por 5mL de disolución de nanopar-

tículas de oro. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación magnética durante 30 minutos (Macromolecules 2006, *39,* 23-25). La reacción se paró disminuyendo la temperatura a 4ºC.

Ejemplo 3.2

*Caracterización del compuesto conjugado*

3.2.1 *Visualización mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)*

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

3.2.2 *Espectro de UV-Vis*

Se registraron los espectros de absorción de UV-Vis de las disoluciones de nanopartículas de oro y del compuesto conjugado obtenido. Las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato muestran un pico característico a 521.2 nm. En cambio cuando se conjugan a HA se produce un desplazamiento del pico de absorción a una longitud de onda mayor en este caso a 523,8 nm.

3.2.3 *Espectro de Potencial Z del compuesto conjugado*

Se determinó el potencial-Z. La conjugación a nanopartículas de los oligómeros de HA derivatizados induce a un desplazamiento del pico de potencial Z a -18.2 mV como se muestra en la Figura 12 con respecto al pico de -48.5 mV correspondiente a las nanopartículas de oro no conjugadas.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto conjugado que comprende:

- al menos una nanopartícula metálica; y

- al menos un oligómero de HA derivatizado a través de, al menos, un enlace químico, con al menos un linker que comprende un grupo -S- por el que se une el oligómero de HA derivatizado a la nanopartícula metálica,

con la condición de que cuando el oligómero de HA presenta un número de monómeros n, siendo n > 1000, y la nanopartícula es de oro con un tamaño de 20 nm, el linker es distinto de $H_2N$-$CH_2$-$CH_2$-SH.

2. Compuesto conjugado según la reivindicación 1, que presenta una estructura que comprende:

una nanopartícula metálica y uno o más oligómeros de HA, en el que cada uno de los oligómeros de HA está derivatizado con un linker a través de un enlace químico, y en la que cada linker une cada oligómero de HA a la nanopartícula metálica.

3. Compuesto conjugado según la reivindicación 1, que presenta una estructura que comprende:

una nanopartícula metálica y uno o más oligómeros de HA, en la que cada uno de los oligómeros está derivatizado con al menos dos linkers los cuales unen cada oligómero de HA a la nanopartícula metálica.

4. Compuesto conjugado según la reivindicación 1, que presenta una estructura que comprende:

uno o más oligómeros de HA derivatizados con más de un linker cada uno, los cuales unen cada oligómero de HA a una o más nanopartículas metálicas.

5. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la nanopartícula metálica se selecciona de entre el grupo formado por nanopartículas y partículas núcleo-coraza y en el que la nanopartícula, el núcleo y la coraza pueden estar independientemente constituidos por un material seleccionado del grupo formado por los metales Au, Ag, Pt, Co, Fe, los óxidos derivados de uno cualquiera de los metales anteriores y $TiO_2$.

6. Compuesto conjugado según la reivindicación 5, en el que la nanopartícula metálica es una nanopartícula de oro.

7. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que la nanopartícula metálica presenta un tamaño medio de diámetro comprendido entre 2 y 100 nm.

8. Compuesto conjugado según la reivindicación 7, en el que el tamaño medio de diámetro está comprendido entre 4 - 50 nm.

9. Compuesto conjugado según la reivindicación 8, en el que el tamaño medio de diámetro está comprendido entre 6-30 nm.

10. Compuesto conjugado según la reivindicación 9, en el que el tamaño medio de diámetro está comprendido entre 8-15 nm.

11. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el oligómero de HA derivatizado comprende entre 1 y un número máximo de monómeros determinado por la naturaleza biológica del propio HA.

12. Compuesto conjugado según la reivindicación 11, en el que el oligómero de HA derivatizado comprende entre 1-1000 monómeros de HA.

13. Compuesto conjugado según la reivindicación 12, en el que el oligómero de HA derivatizado comprende entre 1-100 monómeros de HA.

14. Compuesto conjugado según la reivindicación 13, en el que el oligómero de HA derivatizado comprende entre 2-25 monómeros de HA.

15. Compuesto conjugado según la reivindicación 14, en el que el oligómero de HA derivatizado comprende 3 monómeros de HA.

16. Compuesto conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 11 a 15, en el que el oligómero de HA está derivatizado a través de al menos un enlace químico amida -CONH-, formado entre un grupo ácido carboxílico de un mer de HA y un linker de fórmula general $H_2N$-$R_1$-S-$R_2$ en el que:

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

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

17. Compuesto conjugado según la reivindicación 16, en el que

$R_2$ representa un grupo seleccionado de entre H, -$CH_3$, -$CH_2$-$CH_3$ y -$CH_2$-CH=$CH_2$ y

$R_1$ representa -(CH)(COOH)$(CH_2)_n$- donde n es 1 ó 2.

18. Compuesto conjugado según la reivindicación 16, en la que el linker presenta la fórmula $NH_2$-NH-CO-$(CH_2)_n$-SH, donde n es 2.

19. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 11 a 15, en el que el oligómero de HA está derivatizado según una de las siguientes alternativas:

a) a través de, al menos, un enlace químico éster -COO-, formado entre un grupo ácido carboxílico de un mer de HA y un linker de fórmula general HO-$R_1$-S-$R_2$, ó

b) a través de, al menos, un enlace químico éter, -O- formado entre un grupo -OH del oligómero de HA y un linker de fórmula general GS-$R_1$-S-$R_2$,

donde

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

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

GS representa un grupo saliente.

20. Compuesto conjugado según la reivindicación 19, en el que

$R_2$ representa un grupo seleccionado de entre H, -$CH_3$, -$CH_2$-$CH_3$ y -$CH_2$-CH=$CH_2$ y

$R_1$ representa un grupo -$(CH_2)_n$- donde n representa un número entero comprendido entre 1 y 21.

21. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, que presenta una relación número de mers de HA/número de nanopartículas metálicas comprendida entre 2 y 100000.

22. Procedimiento para la preparación de un compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que comprende:

(i) hidrólisis enzimática de un polímero de HA;

(ii) obtención de los fragmentos oligómeros de HA;

(iii) derivatización de los fragmentos oligómeros de HA por reacción química con un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter; y

(iv) conjugación de al menos un fragmento oligómero de HA derivatizado obtenido en la etapa anterior a al menos una nanopartícula metálica.

23. Procedimiento para la preparación de un compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende:

(i) derivatización de un polímero de HA por reacción química con un linker que comprende un grupo -S- por formación de al menos un enlace químico amida, éster o éter;

(ii) hidrólisis enzimática del polímero de HA derivatizado;

(iii) obtención de fragmentos oligómeros de HA derivatizados; y

(iv) conjugación de al menos uno de los fragmentos obtenidos en la etapa anterior con al menos una nanopartícula metálica.

24. Procedimiento para la preparación de un compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende:

(i) derivatización de un polímero de HA por reacción química con un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter; y

(ii) conjugación del polímero de HA derivatizado obtenido en la etapa anterior a al menos una nanopartícula metálica.

(iii) hidrólisis enzimática del polímero de HA derivatizado;

(iv) obtención del compuesto conjugado.

25. Procedimiento para la preparación de un compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende:

(i) hidrólisis enzimática de un polímero de HA derivatizado con un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter;

(ii) obtención de los fragmentos oligómeros de HA derivatizados; y

(iii) conjugación de al menos un fragmento oligómero de HA derivatizado obtenido en la etapa anterior a al menos una nanopartícula metálica.

26. Procedimiento para la preparación de un compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende:

(i) conjugación de un polímero de HA derivatizado con un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter a al menos una nanopartícula metálica;

(ii) hidrólisis enzimática del producto resultante de la etapa anterior; y

(iii) obtención del compuesto conjugado.

27. Procedimiento para la preparación de un compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende:

(i) biosíntesis mediante la acción de una Hialuronato Sintasa de un fragmento oligómero de HA;

(ii) derivatización del fragmento oligómero biosintetizado con un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter;

(iii) obtención de los fragmentos oligómeros de HA derivatizados; y

(iv) conjugación de al menos un fragmento oligómero de HA derivatizado obtenido en la etapa anterior a al menos una nanopartícula metálica.

28. Procedimiento para la preparación de un compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende:

(v) partir de un polímero u oligómero de HA,

(vi) derivatizarlo con al menos un linker que comprende un grupo -S- a través de al menos un enlace químico amida, éster o éter;

(vii) conjugar un polímero u oligómero de HA derivatizado a una o más nanopartículas metálicas, y

(viii) obtención del compuesto conjugado.

29. Compuesto conjugado obtenible mediante un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28.

30. Compuesto conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende, además, al menos, otra molécula conjugada a, al menos, una nanopartícula metálica.

31. Compuesto multiconjugado según la reivindicación 30, en el que la molécula es un compuesto seleccionado del grupo formado por péptidos, proteínas, e inhibidores de la hidrólisis del HA.

32. Composición cosmética que comprende al menos un compuesto seleccionado entre:

un compuesto conjugado que comprende:

- al menos una nanopartícula metálica; y

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

un compuesto multiconjugado según las reivindicaciones 30 o 31,

junto con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

33. Composición cosmética según la reivindicación 32, para su aplicación tópica o para su aplicación mediante inyección.

34. Composición cosmética según la reivindicación 33, para su aplicación tópica que comprende oligómeros de HA de peso molecular inferior a 1000 kDa.

35. Composición cosmética según la reivindicación 33, para su aplicación mediante inyección que comprende oligómeros de HA de peso molecular superior a 500 kDa.

36. Empleo de al menos un compuesto seleccionado entre:

un compuesto conjugado que comprende:

- al menos una nanopartícula metálica; y

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

un compuesto multiconjugado según las reivindicaciones 30 o 31,

en la elaboración de una composición cosmética para su aplicación tópica o para su aplicación mediante inyección en la piel.

37. Tratamiento cosmético sobre el cuerpo humano que comprende la aplicación de una composición cosmética según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35.

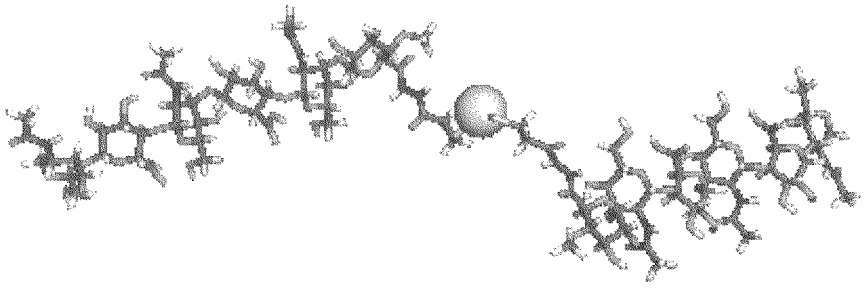


Figura 1

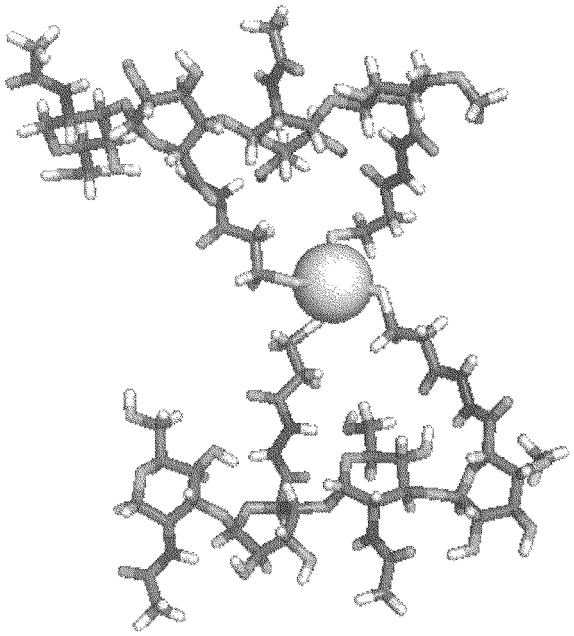


Figura 2

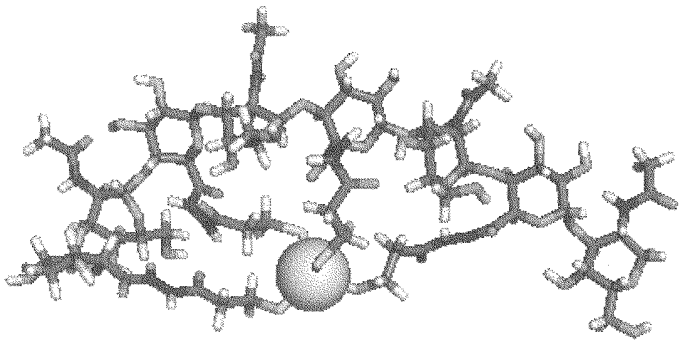


Figura 3

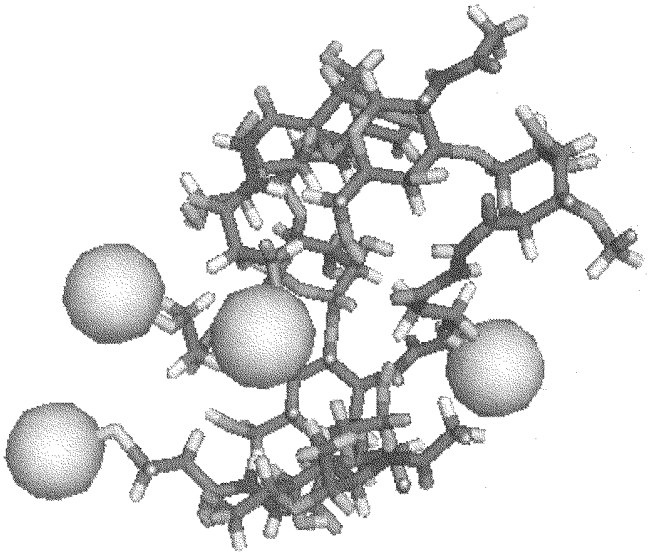


Figura 4

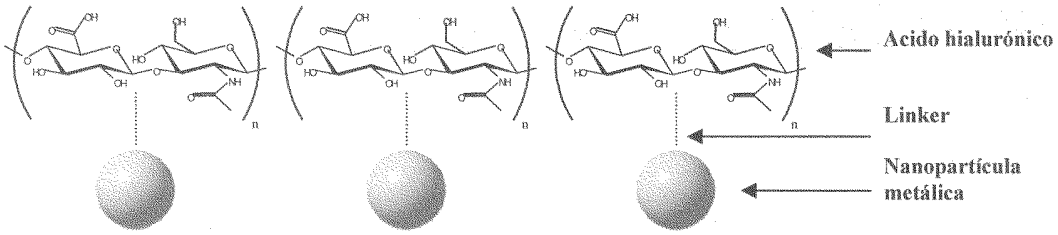



**Figura 5**

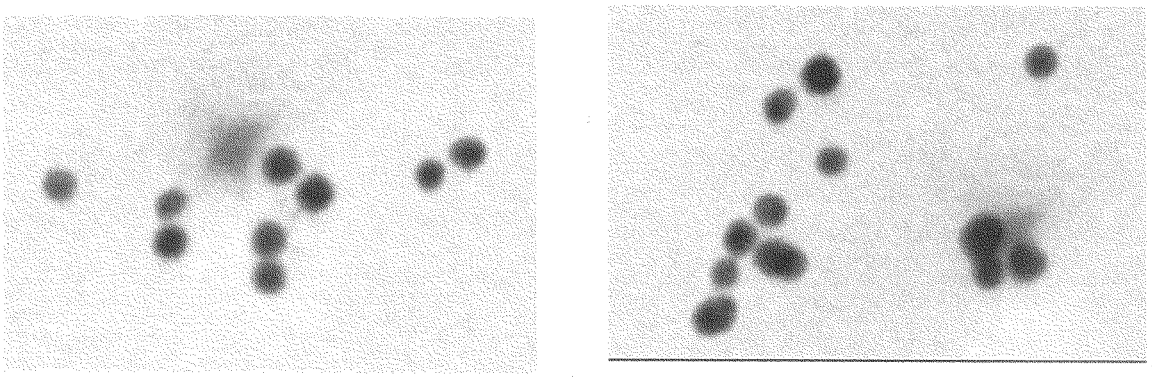


Figura 6

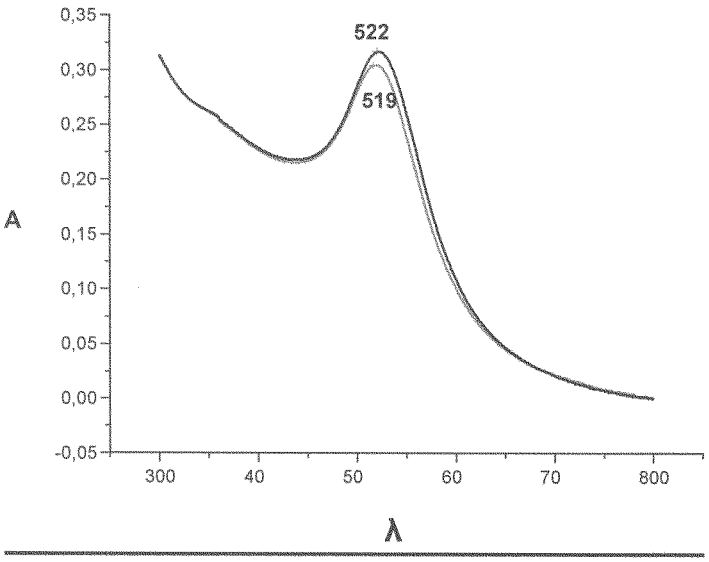



Figura 7

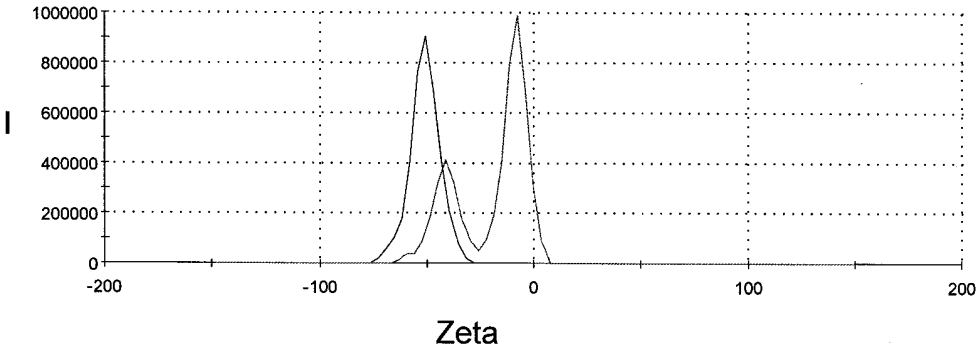
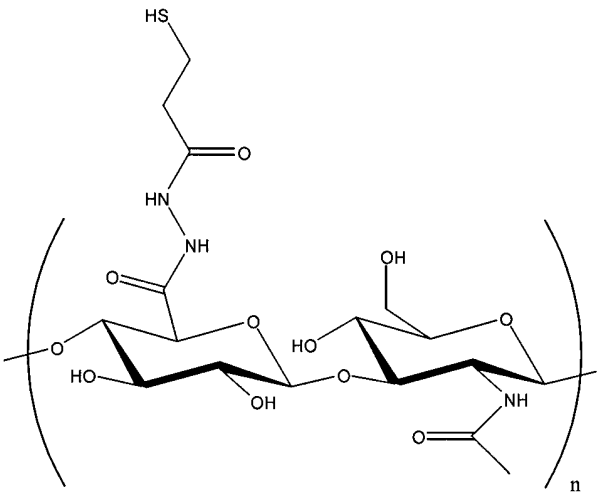



Figura **8**




***thiopropionylhydrazide-HA***

Figura 9

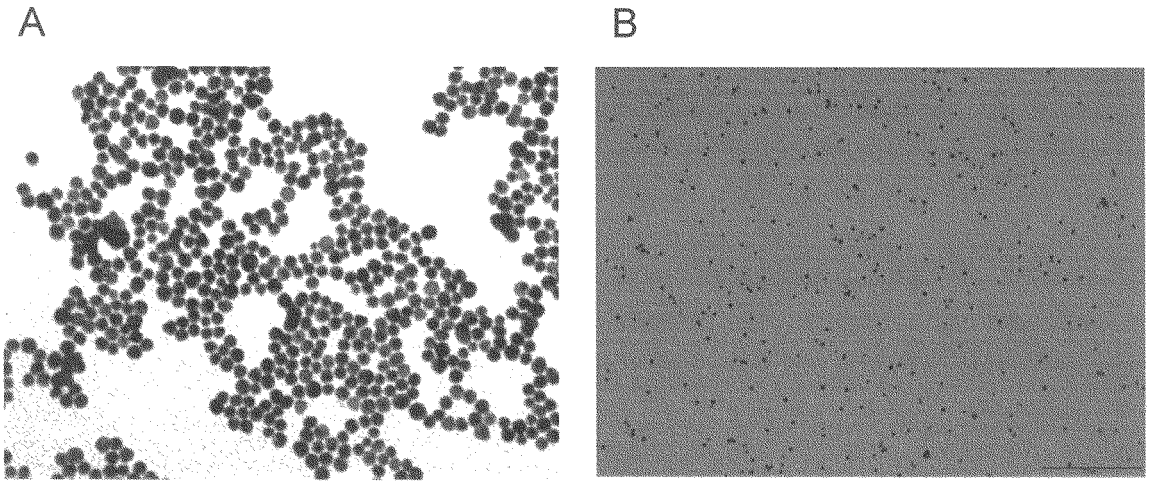



Figura 10

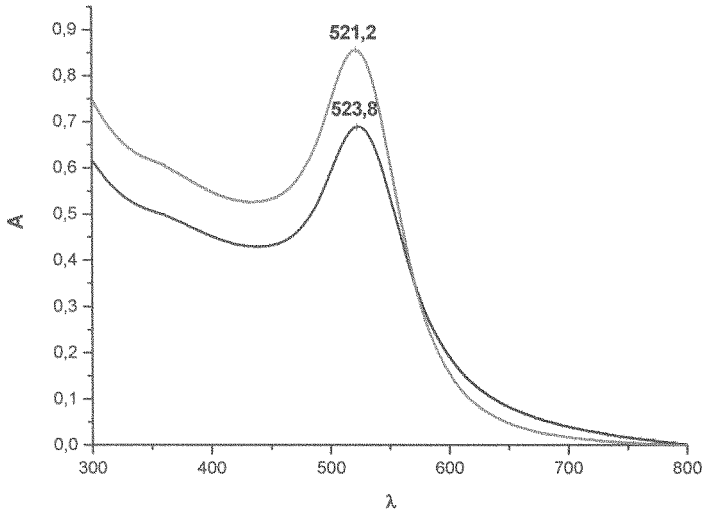



Figura 11

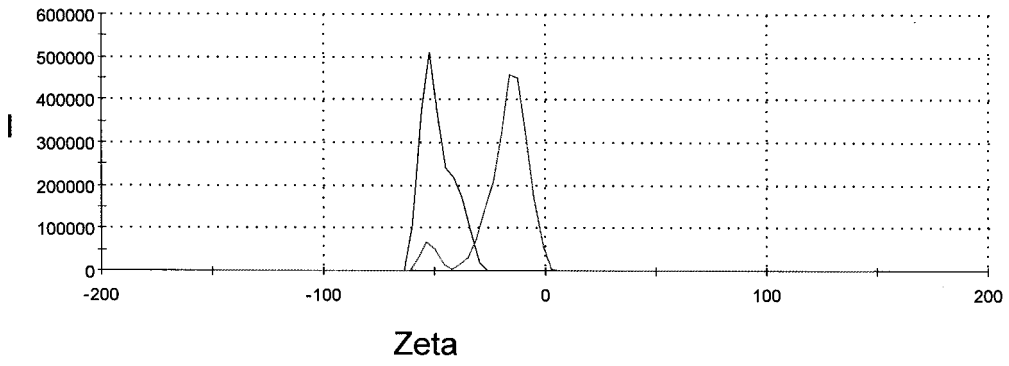

600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
I
-200
-100
0
100
200
Zeta

Figura 12

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 326 721

(21) Nº de solicitud: 200800011

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **04.01.2008**

(32) Fecha de prioridad:

# INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** ***C08B 37/00*** (2006.01)

## DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | (56) Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|---|---|---|
| Y | H. LEE et al., " Direct visualization of hyaluronic acid polymer chain by self-assembled one-dimensional array of gold nanoplarticles", Macromolecules, 2006, vol. 39, nº 1, páginas 23-25. | 1-31 |
| Y | X. Z. SHU et al., "Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels" Biomacromolecules, 2002, vol. 3, nº 6, páginas 1304-1311, ver figura 2. | 1-31 |
| A | WO 9010020 A1 (RICHTER GEDEON VEGYESZET) 07.09.1990, página 1, líneas 13-23; ejemplos; reivindicaciones. | 1-37 |
| A | US 20027128512 A1 (P. C. A. BULPITT et al.) 12.09.2002, reivindicaciones; ejemplos. | 1-31 |

**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 | Examinador | Página |
|---|---|---|
| 25.09.2009 | E. Dávila Muro | 1/4 |

**INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA**

Nº de solicitud: 200800011

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

C08B

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,CAPLUS,BIOSIS

**OPINIÓN ESCRITA**

Nº de solicitud: 200800011

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.09.2009

**Declaración**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)** | Reivindicaciones | 1-37 | **SÍ** |
| | Reivindicaciones | | **NO** |
| **Actividad inventiva** | Reivindicaciones | 32-37 | **SÍ** |
| **(Art. 8.1 LP 11/1986)** | Reivindicaciones | 1-31 | **NO** |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial.** Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|---|---|---|
| D01 | Macromolecules, 2006, vol. 39, nº 1, páginas 23-25 | 2006 |
| D02 | Biomacromolecules, 2002, vol. 3, nº 6, páginas 1304-1311 | 2002 |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención reivindicada se refiere a un compuesto conjugado que comprende una nanopartícula metálica, en concreto de Au y con un tamaño de 20 nm, y un oligómero de ácido hialurónico (HA) sustituído con un fragmento enlazante ("linker") que une el oligómero a la nanopartícula metálica, siendo este fragmento distinto de H2N-CH2CH2-NH2. También se reivindica la preparación del compuesto conjugado, la elaboración de composiciones cosméticas que contienen dicho conjugado, así como el uso de dichas composiciones en tratamientos cosméticos.

El documento D01, que se considera el estado de la técnica más próximo a la invención, divulga la preparación de conjugados de nanopartículas de Au de 20 nm con oligómeros de ácido hialurónico sustituído con cadenas alquílicas terminadas con grupos SH. La introducción química de estos sustituyentes se hace por reacción de los grupos carboxilo del HA con cistamina previa activación con EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) y HOBT (1-hidroxibenzotriazol); a continuación se hace reaccionar con DTT (ditiotreitol) para reducir los enlaces disulfuro S-S, quedando sustituído el HA con cadenas -NHCH2CH2-SH. Una vez obtenidos los oligómeros de Ha tiolados, se hacen reaccionar con las nanopartículas de Au.

El problema técnico que plantea la solicitud radica en proporcionar conjugados de nanopartículas de Au con oligómeros de HA modificados con fragmentos enlazantes que comprendan grupos SH distintos de H2N-CH2CH2-NH2. La solución propuesta en la solicitud supone utilizar otros reactivos que contengan grupos SH como ditiobis(propano hidrazida), tal como se menciona en el ejemplo 2 de la invención, para modificar los oligómeros de HA.

El documento D02 divulga la preparación de HA modificado con grupos tiol mediante reacción del HA con ditiobis(propanohidrazida) (DTP) y ditiobis(butanohidrazida) (DBT) en presencia de carbodiimida, seguido de reducción de los grupos disulfuro con ditiotreitol. De esta forma se consigue funcionalizar HA con cadenas tiopropilhidrazida -NHNHC=OCH2CH2SH (ver páginas 1305-1306, figura 2).

Resulta obvio para un experto en la materia, sobre todo cuando se pretende obtener el mismo resultado, conjugados de nanopartículas de AU con oligómeros de HA que contengan susituyentes con grupos tiol, utilizar un reactivo de tipo tiopropilhidrazida como se describe en D02 para obtener oligómeros de HA modificados con un fragmento enlazante -NHNHC=OCH2CH2SH como alternativa a los sustituyentes -NHCH2CH2-SH que modifican los oligómeros de HA descritos en D01. Por lo tanto, el objeto de la invención según las reivindicaciones 1-31 se considera que no implica actividad inventiva según el art. 8.1 LP 11/1986.

Respecto a las reivindicaciones 32-37 que se refieren a composiciones cosméticas que contienen estos conjugados y su uso en tratamientos cosméticos, ninguno de los documentos anteriores menciona la utilización de compuestos conjugados con estas características en preparaciones cosméticas. Por lo tanto, el objeto de la invención según las reivindicaciones 32-37 se considera que es nuevo y que implica actividad inventiva según los arts. 6.1 y 8.1 LP 11/1986