

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 360**

51 Int. Cl.:  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C07K 14/81** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**A61K 38/08** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04810431 .9**  
96 Fecha de presentación: **06.11.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1692158**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **PÉPTIDOS SOPORTADOS Y DE UNIÓN A VEGF PARA TRATAR ENFERMEDADES DE LA PIEL.**

30 Prioridad:  
**06.11.2003 US 518154 P**  
**13.11.2003 US 520403 P**  
**19.12.2003 US 531189 P**  
**19.12.2003 US 531207 P**  
**19.12.2003 US 530954 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.02.2012**

73 Titular/es:  
**Danisco US Inc.**  
**925 Page Mill Road**  
**Palo Alto, CA 94304, US**

72 Inventor/es:  
**DAY, Anthony, G.;**  
**ESTELL, David, A.;**  
**MURRAY, Christopher, J. y**  
**POWER, Scott, D.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 375 360 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

Péptidos soportados y de unión a VEGF para tratar enfermedades de la piel

5 **Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención proporciona péptidos y péptidos soportados para tratar enfermedades proliferativas tal como se define en las reivindicaciones. En las formas de realización particularmente preferidas, la presente invención proporciona péptidos y péptidos soportados para tratar enfermedades de la piel tales como rosácea.

**Antecedentes de la invención**

**[0002]** La angiogénesis es el desarrollo del suministro de la sangre a una zona dada de tejido. La angiogénesis es parte del desarrollo embrionario normal y de la revascularización de las bases de las heridas, y análogamente se debe a la estimulación del crecimiento del vaso por células inflamatorias o malignas. La angiogénesis es también el proceso a través del cual los tumores o dolencias inflamatorias derivan un suministro de sangre a través de la generación de microvasos.

**[0003]** La angiogénesis está regulada en tejidos cancerosos normales y malignos mediante el equilibrio de estímulos angiogénicos e inhibidores angiogénicos que se producen en el tejido diana y en sitios distantes (Véase, Fidler y col., [1998]; y McNamara y col., [1998]). El factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF, conocido también como factor de permeabilidad vascular, "VPF") es un estimulante primario de la angiogénesis. VEGF es una citocina multifuncional que está inducida por hipoxia y mutaciones oncogénicas y se puede producir por una amplia variedad de tejidos (véase, Kerbel y col., [1998]; y Mazure y col., [1996]).

**[0004]** El reconocimiento de VEGF como un estímulo primario de la angiogénesis en dolencias patológicas ha conducido a algunos intentos de bloquear la actividad de VEGF. Se han propuesto anticuerpos receptores inhibidores contra VEGF, construcciones de receptores solubles, estrategias de sentido contrario, aptámeros del ARN contra VEGF e inhibidores del receptor VEGF de la tirosina cinasa (RTK) de bajo peso molecular para su uso en la interferencia con la señalización de VEGF (Véase, Siemeister y col., [1998]). De hecho, se han mostrado anticuerpos monoclonales contra VEGF para inhibir el crecimiento del tumor xenográfico y la formación de ascites en ratones (Véase, Kim y col., [1993]; Asano y col., [1998]; Mesiano y col., [1998]; Luo y col., [1998a] y [1998b]; y Borgstrom y col., [1996] y [1998]).

**[0005]** Los RTK comprenden una numerosa familia de receptores transmembrana para factores de crecimiento de polipéptidos con diversas actividades biológicas. La función intrínseca de RTKS se activa tras la unión del ligando, lo que da como resultado la fosforilación del receptor y de múltiples sustratos celulares, y posteriormente, una variedad de respuestas celulares (Véase, Ullrich & Schlessinger, Cell 61: 203-212 [1990]).

**[0006]** La angiogénesis, que implica VEGF y los RTK no solo está implicada en el desarrollo del cáncer, ya que muchas otras enfermedades o dolencias que afectan diferentes sistemas fisiológicos son dependientes de la angiogénesis, tales como la artritis y las placas ateroscleróticas (hueso y ligamentos), la retinopatía diabética, el glaucoma neovascular, la degeneración macular, el herpes ocular, el tracoma y la neovascularización del injerto de córnea (ojo), la psoriasis, el escleroderma, la rosácea, el hemangioma y la cicatrización hipertrófica (piel), las adherencias vasculares y el angiofibroma (sistema sanguíneo).

**[0007]** VEGF es un factor angiogénico de importancia principal para la vascularización de la piel (Detmar [2000]). La expresión de VEGF está regulada en exceso en la epidermis hiperplásica de la psoriasis (Detmar y Yeo y col. [1995]), (Detmar y Yeo y col. [1995]), en la cicatrización de heridas y en otras enfermedades de la piel caracterizadas por la potenciación de la angiogénesis (Detmar [2000], *más arriba*). Se informó que la expresión en exceso de VEGF en la epidermis de ratones transgénicos daba como resultado una potenciación de la vascularización de la piel con números iguales de vasos sanguíneos tortuosos y permeables (Véase, *por ejemplo*, Brown y col., [1998]). También, la síntesis crónica de VEGF en la piel de ratones conduce al primer modelo de murino histológicamente equivalente de psoriasis humana (Xia y col., [2003]) que es reversible mediante la unión de agentes específicos para VEGF.

**[0008]** Piossek y col., 1999, J. Biol. Chem., Vol. 274, No. 9, pp. 5612-5619, describen péptidos derivados del receptor II del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que inhiben VEGF.

**[0009]** Bae y col., 2000, J. Biol. Chem. Vol. 275, No. 18, pp. 13588-13596, describen péptidos contra VEGF ricos en arginina que inhiben el crecimiento tumoral y la metástasis mediante el bloqueo de la angiogénesis.

**[0010]** El documento WO 01/79479 describe procedimientos de dirección selectiva para cribar una biblioteca de

ligando con el fin de identificar los ligandos unidos a diana. Entre los péptidos dados a conocer están los péptidos que se unen a VEGF identificados mediante ciclos de selección por afinidad.

5 **[0011]** El documento WO 02/48189 describe bibliotecas combinatorias de proteínas que tienen la estructura de un almacén de los dominios similares a lectina de tipo C.

**[0012]** Fernandez-Carneado y col., 2001, Biopolymers, Vol. 55, pp. 451-458, describen el rediseño de proteínas mediante genomanipulación usando injerto molecular en las superficies de las moléculas en armazones de proteínas sintéticas ensamblados en moldes.

10

**[0013]** Ye y Ding, 1999, Acta Biophysica Sinica, Vol. 15, No. 4, pp. 751-757, describen técnicas para genomanipular proteínas novedosas mediante injerto en sitios activos en armazones naturales.

15 **[0014]** El inhibidor de la proteasa de Bowman-Birk (BBI) es la designación de una familia de inhibidores de la enzima tripsina y quimotripsina de bajo peso molecular que se encuentra en soja y otras diversas semillas, principalmente semillas de leguminosa y materiales vegetales. BBI comprende una familia de proteínas unidas a disulfuro con peso molecular de aproximadamente 8 kD (Véase por ejemplo, Chou y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1748-1752 [1974]; Yavelow y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5395-5399 [1985]; y Yavelow y col., Cancer Res. (Suppl.) 43: 2454s-2459s [1983]). BBI tiene una estructura pseudosimétrica de dos dominios tricíclicos  
20 conteniendo cada uno un bucle de unión natural independiente, los bucles naturales contienen sitios de unión para la tripsina y la quimotripsina (Véase, Liener, en Summerfield y Bunting (eds), Advances in Legume Science, Royal Bot. Gardens, Kew, Inglaterra). Estos sitios de unión tienen una estructura de bucle clásica, que es un motivo unido en una variedad de inhibidores de la serina proteinasa (Bode y Huber, Eur. J. Biochem., 204: 433-451 [1992]).

25 **[0015]** Comúnmente, como en uno de los inhibidores de la soja, uno de los bucles naturales inhibe la tripsina y el otro inhibe la quimotripsina (Véase, Chen y col., J. Biol. Chem., 267: 1990-1994 [1992]; Werner y Wemmer, Biochem., 31: 999-1010 [1992]; Lin y col., Eur. J. Biochem., 212: 549-555 [1993]; y Voss y col., Eur. J. Biochem., 242: 122-131 [1996]) considerado en otros organismos (*por ejemplo., Arabidopsis*), ambos bucles son específicos de tripsina.

30

**[0016]** STI inhibe la actividad proteolítica de la tripsina mediante la formación de un complejo estequiométrico estable (Véase, *por ejemplo*, Liu, Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components, En: Soybeans, Chemistry, Technology and Utilization, pp. 32-35, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Md., [1999]). STI consta de 181 restos de aminoácidos con dos puentes disulfuro y está conformado aproximadamente en forma de esfera  
35 (Véase, *por ejemplo*, Song y col., J. Mol. Biol., 275:347-63 [1998]). El bucle inhibidor de la tripsina se encuentra en el primer puente disulfuro. El inhibidor de la tripsina de soja de tipo Kunitz (STI) ha jugado un papel clave en el estudio inicial de las proteinasas. Que se ha usado como sustrato principal en la bioquímica y cinética de trabajo que condujo a la definición del mecanismo de acción normalizado de los inhibidores de la proteinasa.

40 **[0017]** Eglina C es una pequeña proteína monomérica que pertenece a la familia de inhibidores de la quimotripsina de la patata de los inhibidores de la serina proteasa. Las proteínas que pertenecen a esta familia son usualmente pequeñas (60-90 restos de aminoácidos de longitud) y no contienen enlaces disulfuro. Eglina C, sin embargo, es muy resistente a la desnaturalización mediante la acidificación o el calor, sin tener en cuenta la falta de enlaces disulfuro para ayudar a estabilizar su estructura terciaria. La proteína se produce naturalmente en la sanguijuela  
45 *Hirudo medicinalis*.

### **Resumen de la invención**

50 **[0018]** La presente invención proporciona péptidos y péptidos soportados para tratar enfermedades proliferativas tal como las definidas en las reivindicaciones. En realizaciones particularmente preferidas, la presente invención proporciona péptidos y péptidos soportados para tratar enfermedades de la piel, tales como rosácea. Los péptidos soportados de la presente invención son péptidos contra VEGF. Los péptidos contra VEGF se expresan en una proteína de almacén del inhibidor de la proteasa. En algunas realizaciones más preferidas, la proteína de almacén es BBI.

55

**[0019]** En algunas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona compuestos cosméticos y/o farmacéuticos, tal como se define en las reivindicaciones, adecuados para mejorar la apariencia de la piel. La presente invención proporciona además péptidos que bloquean la unión de VEGF. El péptido se expresa en un almacén que es un inhibidor de la proteasa (*por ejemplo*, BBI, STI, o inhibidor de la quimotripsina Eglina). En  
60 algunas realizaciones más preferidas, el inhibidor de la proteasa es BBI.

**[0020]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos cosméticos y/o farmacéuticos para mejorar la apariencia de la piel que comprenden al menos un polipéptido o un péptido, tal como se define en las

reivindicaciones.

**[0021]** El polipéptido o péptido se une a VEGF.

5 **[0022]** En algunas realizaciones, los compuestos comprenden al menos un péptido, mientras que en otras realizaciones, los compuestos comprenden al menos un polipéptido. En algunas realizaciones preferidas, el péptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-7. En realizaciones adicionales preferidas, el péptido tiene una secuencia de unión conservada, siendo la secuencia XXLWPXWC (SEQ ID NO: 15).

10

**[0023]** En realizaciones adicionales, la secuencia es la SEQ ID NO: 17. En realizaciones adicionales, la secuencia comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 22-24. En algunas realizaciones preferidas, el polipéptido tiene un peso molecular que está preferiblemente entre 500 Daltons y 30.000 Daltons, más preferiblemente entre 1000 Daltons y 10.000 Daltons, y lo más preferible entre 1500 Daltons y

15

**[0024]** Los compuestos encuentran uso en la mejora de la piel en un organismo (es decir, un sujeto) que tiene un trastorno de la piel. En algunas realizaciones preferidas, el trastorno de la piel es un trastorno de la piel angiogénico. En realizaciones preferidas adicionales, el trastorno de la piel es al menos uno seleccionado entre el grupo que

20

**[0025]** En otras realizaciones preferidas, la presente invención proporciona compuestos cosméticos y/o farmacéuticos para mejorar la apariencia de la piel. En estas realizaciones preferidas, los compuestos comprenden

25

al menos un péptido o polipéptido y al menos un armazón, expresándose el péptido o el polipéptido en el armazón. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el al menos un péptido o polipéptido es un bucle. En otras realizaciones particularmente preferidas, el bucle se cierra mediante un enlace disulfuro. El polipéptido o péptido se une a VEGF. El armazón es un inhibidor de la proteasa (*por ejemplo*, BBI, STI, o inhibidor de la quimotripsina Eglina). En algunas realizaciones más preferidas, el inhibidor de la proteasa es BBI.

30

**[0026]** En algunas realizaciones preferidas, los compuestos comprenden además al menos un péptido. Preferiblemente, el péptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-7 y 17. Lo más preferible, los compuestos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 22-24. En algunas realizaciones preferidas, el péptido tiene una

35

secuencia de unión conservada, siendo la secuencia XXLWPXWC (SEQ ID NO: 15). El peso molecular del péptido está preferiblemente entre 500 Daltons y 45.000 Daltons, más preferiblemente entre 1000 Daltons y 12.000 Daltons, y lo más preferible entre 1500 Daltons y 10.000 Daltons. En algunas realizaciones preferidas, los compuestos comprenden al menos un polipéptido.

40

**[0027]** La presente invención proporciona composiciones que comprenden al menos un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-7 y 18, en las que el péptido se une a un factor de crecimiento endotelial vascular, y en las que el péptido se expresa en un armazón que es un inhibidor de la proteasa. En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor de la proteasa se selecciona entre el grupo que consiste en el inhibidor de Bowman-Birk, el inhibidor de la tripsina de soja, y el inhibidor de la quimotripsina Eglina. En algunas de las

45

realizaciones más preferidas, el armazón es un inhibidor de Bowman-Birk. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la composición comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 22-24. En realizaciones adicionales, el armazón comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 19. En otras realizaciones

50

adicionales, el armazón comprende unas secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 20 y 21. En otras realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 20 y 21 están sustituidas por al menos un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS 1-7 y 17.

55

**[0028]** La presente invención proporciona también composiciones cosméticas y/o farmacéuticas tal como se define en las reivindicaciones que comprenden al menos un péptido que se une a un factor de crecimiento endotelial vascular. En algunas realizaciones, la composición es capaz de modular la angiogénesis. En realizaciones adicionales, la composición comprende además un armazón que comprende un inhibidor de la proteasa. En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor de la proteasa se selecciona entre el grupo que consiste en el inhibidor de Bowman-Birk, el inhibidor de la tripsina de soja, y el inhibidor de la quimotripsina Eglina en algunas realizaciones

60

preferidas, el armazón es un inhibidor de Bowman-Birk. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el armazón comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones alternativas, el armazón comprende las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 20 y 21. En realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos que se

muestran en las SEQ ID NOS: 20 y 21 están sustituidas por al menos un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-7 y 17.

**[0029]** La presente invención proporciona también composiciones tal como se define en las reivindicaciones para el uso en procedimientos para modular la angiogénesis que comprenden: i) proporcionar una composición que comprende un péptido contenido en el interior de un armazón; ii) proporcionar un sujeto que se va a tratar; y iii) aplicar la composición al sujeto en una zona en la que se desea la modulación de la angiogénesis. El péptido se une a un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En algunas realizaciones preferidas, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es VEGF-A. En realizaciones preferidas adicionales, el armazón se selecciona entre el grupo que consiste en el inhibidor de Bowman-Birk, el inhibidor de la tripsina de soja, y el inhibidor de la quimotripsina Eglina. En algunas realizaciones particularmente preferibles, el armazón es el inhibidor de Bowman-Birk. En algunas realizaciones adicionales, el armazón comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 19. En otras realizaciones adicionales, el armazón comprende las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 20 y 21. En algunas realizaciones particularmente preferidas, las secuencias, las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 20 y 21 están sustituidas por al menos un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-7 y 17. En realizaciones particularmente preferidas más adicionales, el armazón y el péptido están codificados por una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 22-24.

**[0030]** La presente invención proporciona también composiciones tal como se define en las reivindicaciones para el uso en procedimientos para disminuir la actividad de un factor de crecimiento endotelial vascular que comprende las etapas de: i) proporcionar un sujeto; e ii) administrar la composición que comprende al menos un péptido que se une al factor de crecimiento endotelial vascular al sujeto, en condiciones tales que se disminuye la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es VEGF-A. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la composición comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 22-24.

**[0031]** En algunas realizaciones preferidas adicionales, los compuestos son para su uso en la mejora de la piel en un organismo (es decir, un sujeto) que tiene un trastorno de la piel. En realizaciones preferidas adicionales, el trastorno de la piel es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en psoriasis, úlceras venosas, acné, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas y linfangiogénesis, etc. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el trastorno de la piel es una rosácea.

**[0032]** En otras realizaciones adicionales, la presente invención proporciona composiciones cosméticas y/o farmacéuticas que comprenden al menos un polipéptido o péptido, tal como se define en las reivindicaciones, y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. Preferiblemente, el compuesto está presente en una cantidad de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 5% en peso basándose en el peso total de la composición. También de manera preferible, el compuesto está presente en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5% en peso del peso total de la composición. La composición puede estar en la forma de un vehículo emulsificado, tal como una crema o loción nutritiva, un gel estabilizado o un sistema de dispersión, un suero de tratamiento, un sistema de administración liposómica, un pack o mascarilla tópica, un sistema de limpieza basado en tensioactivo tal como un champú o gel líquido, una dispersión o emulsión de tipo aerosol o pulverizada, un acondicionador del cabello o la piel, un adyuvante para proporcionar estilo, o un producto pigmentado tal como un maquillaje, así como otras preparaciones de maquillaje y cosméticas adecuadas. En algunas realizaciones, el vehículo es preferiblemente al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en agua, propilenglicol, etanol, propanol, glicerol, butilenglicol y polietilenglicol.

**[0033]** En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona aplicaciones para el tratamiento del cabello y/o la piel, así como aplicaciones de cicatrización de heridas, tratamiento de enfermedades proliferativas, etc. De esta manera, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos adecuados para la aplicación en/sobre seres humanos y otros animales, tal como se define en las reivindicaciones.

### **Descripción de las Figuras**

**[0034]**

La Figura 1 proporciona un resumen de la secuencia de los clones de fagos que se unen a VEGF (SEQ ID NOS: 1-14). Se secuenciaron veinticuatro clones de fagos después de 3 ciclos de selección por afinidad. El árbol de alineación de la secuencia indica un motivo de secuencia muy conservado ACXLWPXXWC (SEQ ID NO:18). El número entre paréntesis representa la frecuencia de esta secuencia en el interior de los 24 clones secuenciados después del tercer ciclo de selección por afinidad.

La Figura 2 proporciona resultados de un ELISA de fago para demostrar la unión de clones únicos a VEGF y no a

BSA. Se evaluaron cantidades equivalentes de fagos para determinar su afinidad de unión relativa a haVEGF<sub>165</sub>. El número de clones y la secuencia aleatorizada se indican a continuación de cada símbolo. Se detectaron fagos unidos a dianas con anti.M13-HRP. Se controló el HRP con sustrato ABTS a una A<sub>405 nm</sub> después de 30 minutos (n=3).

5

La Figura 3 proporciona resultados de un análisis de unión BIACORE de péptidos de unión a VEGF. Se obtuvieron las curvas de unión tales como se describe en los Ejemplos. Se ajustaron los datos a dos modelos de reacción de estado con cambios de conformación; el analito (A) se une al ligando (B) para formar el complejo AB. El complejo AB cambia a AB' que no se puede disociar directamente a A + B. El panel A proporciona resultados del péptido biotinilado CK37281.  $k_{a1}=2,84e^3 M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{d1}=0,0122 s^{-1}$ ,  $k_{a2}=1,5e^{-3} s^{-1}$ ,  $k_{d2}=3,36e^{-3} s^{-1}$ ,  $K_D=1,92e^{-6} M$ . El panel B proporciona resultados de CK37283 (6000 RU VEGF, 3500 RU TNFO sin tampón, solo sustracción);  $k_{a1}=1,24e^4 M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{d1}=0,318 s^{-1}$ ,  $k_{a2}=6,34e^{-3} s^{-1}$ ,  $k_{d2}=1,23e^{-3} s^{-1}$ ,  $K_D=4,90e^{-6} M$ . El panel C proporciona resultados del péptido control v14 (1000 RU VEGF, 850 RU TNFO). Se ajustaron los datos a una unión de Langmuir 1:1  $k_{a1}=7,51e^5 M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{d1}=0,167 s^{-1}$ ,  $K_D=2,23e^{-7} M$ .

15

La Figura 4 proporciona cartografías de plásmidos usadas en los Ejemplos. El panel A proporciona la cartografía del fagémido de expresión pCB04WT para la expresión de His6X C terminal etiquetado con beta-lactamasa. El panel B proporciona la cartografía del fagémido relleno N-terminal pME22 para la clonación usando sitios de restricción Bbs1. El panel C proporciona la cartografía del fagémido de expresión de la fusión VEGF-BLA N-terminal pCM01.

20

La Figura 5 proporciona un resumen de la estrategia de clonación de la fusión N-terminal usando sitios de clonación Bbs1 (SEQ ID NOS: 32-42).

La Figura 6 proporciona un gel SDS-PAGE de etiqueta His purificada con fusiones de beta-lactamasa con péptidos. Se concentraron versiones BLA purificadas con IMAC y diferentes péptidos y se introdujeron sobre un gel SDS PAGE (4-12%). Bandas 1 y 10: marcadores de PM. Banda 2: pCB04 (WT con etiqueta 6Xhis); Bandas 3, 4, 5, 6: pCM01 un armazón de proteína de fusión N-terminal VEGF-BLA; y Bandas 7, 8: una proteína de fusión N-terminal de aquimotripsina pCM02-BLA.

La Figura 7 proporciona una gráfica que muestra que una fusión de péptido VEGF-BLA se une específicamente a VEGF. Se añadieron concentraciones crecientes de pCM01 (una fusión de péptido VEGF-BLA) y pCB04 (WT) a pocillos revestidos con VEGF en una placa de microvaloración. Se midió la actividad de la nitrocefina unida residual después del lavado 5X con tampón de ensayo de nitrocefina (0,125% n-octil-beta-D-glucopiranosido en PBS).

La Figura 8 proporciona una gráfica que muestra la inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF por el péptido anti-VEGF (círculos rellenos). Se controló la proliferación mediante incorporación radioactiva de <sup>3</sup>H timidina (n = 3). Se usó anticuerpo dirigido contra VEGF (círculos abiertos) como un control positivo, tal como se describe en los Ejemplos.

La Figura 9 proporciona la secuencia del gen BBI (SEQ ID NO: 19) diseñada para una clonación eficaz. La secuencia señal de la proteína está en cursiva mientras que el bucle de tripsina (CTKSNPPQC; SEQ ID NO: 20) y el bucle de quimotripsina (CALSYPACQ; SEQ ID NO: 21) están destacados en negrita.

La Figura 10 proporciona un gel SDS PAGE que muestra los resultados del replegado de BBI anti-VEGF. Se replegó BBI anti-VEGF en presencia o ausencia de subtilisina BPN' Y217L. Las bandas son como sigue: Banda 1: tampón de replegado Hampton Foldit 11, -subtilisina; Banda 2: tampón de replegado Hampton Foldit 11, + subtilisina; Banda 3: tampón de replegado Hampton Foldit 11, -subtilisina; Banda 4: tampón de replegado Hampton Foldit 11, + subtilisina, y Banda 5, Marcadores de peso molecular.

La Figura 11 proporciona una gráfica que muestra que BBI-VEGF1 (SEQ ID NO: 22) se une específicamente a VEGF.

La Figura 12 proporciona una gráfica que muestra los resultados de HUVEC para los péptidos designados.

La Figura 13 proporciona secuencias de tres fusiones BBI-VEGF, BBI-VEGF1 (SEQ ID NO: 22), BBI-VEGF2 (SEQ ID NO: 23) y BBI-VEGF12 (SEQ ID NO: 24). Las fusiones BBI-VEGF1 y BBI-VEGF2 tienen solo uno de los bucles de unión sustituidos; la fusión BBI-VEGF12 tiene ambos bucles de unión sustituidos.

### **Descripción de la invención**

60

**[0035]** La presente invención proporciona péptidos y péptidos soportados tal como se define en las reivindicaciones para tratar enfermedades proliferativas. En realizaciones particularmente preferidas, la presente invención proporciona péptidos y péptidos soportados para tratar enfermedades de la piel tales como rosácea. Los

péptidos soportados de la presente invención son péptidos contra-VEGF, que se expresan en una proteína de armazón inhibitora de la proteasa. En algunas de las realizaciones más preferidas, las proteínas de armazón son BBI.

5 **[0036]** A no ser que se indique otra cosa, la práctica de la presente invención implica técnicas convencionales comúnmente usadas en biología molecular, microbiología, y ADN recombinante, que están comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Los expertos en la materia conocen dichas técnicas y se describen en numerosos textos y trabajos de referencia (véase, por ejemplo, Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda Edición (Cold Spring Harbor), [1989]); y Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology"  
10 [1987]).

**[0037]** A no ser que se defina de otra manera en la presente memoria descriptiva, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que una persona normalmente experta en la materia entiende comúnmente, a la cual esta invención pertenece. Por ejemplo, Singleton y Sainsbury,  
15 Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª Ed., John Wiley and Sons, NY (1994); y Hale y Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a los expertos en la materia diccionarios generales de muchos de los términos usados en la invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria descriptiva encuentra uso en la práctica de la presente invención, se describen en la presente memoria descriptiva los procedimientos y materiales preferidos. De  
20 acuerdo con esto, los términos definidos inmediatamente a continuación se describen más completamente por referencia a la Memoria como un todo. También, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el singular "un", "uno" y "el" incluye la referencia en plural a no ser que el contexto indique claramente otra cosa. Los intervalos numéricos son inclusive de los números que definen el intervalo. A no ser que se indique otra cosa, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de  
25 izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi, respectivamente. Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, y reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar, dependiendo del contexto en que los expertos en la materia los usen.

**[0038]** Además, los encabezados proporcionados en la presente memoria descriptiva no son limitaciones a los  
30 diversos aspectos de las realizaciones de la invención que se pueden hacer por referencia a la memoria como un todo. De acuerdo con esto, los términos definidos inmediatamente a continuación están más completamente definidos por referencia a la memoria como un todo. No obstante, con el fin de facilitar la comprensión de la invención, se definen numerosos términos a continuación.

### 35 **Definiciones**

**[0039]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "factor de crecimiento endotelial vascular" (VEGF) se refiere a las proteínas con capacidad de estimular el crecimiento vascular que incluyen aquellas designadas "VEGF-A" conocidas por los expertos en la técnica.

40 **[0040]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "anti-VEGF" (aVEGF) se refiere a péptidos y otras composiciones que reconocen (es decir, se unen) a VEGF. En las realizaciones preferidas, estos péptidos/composiciones modulan la actividad de VEGF.

**[0041]** El término "angiogénesis" se refiere a procesos biológicos que dan como resultado el desarrollo de vasos  
45 sanguíneos y/o aumentan la vascularidad del tejido en un organismo. En las realizaciones particulares en la presente memoria descriptiva, el término se refiere al proceso a través del cual los tejidos tumorales u otros que proliferan rápidamente derivan un suministro de sangre a través de la generación de microvasos.

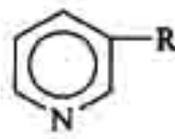
**[0042]** Los términos "enfermedad angiogénica", "trastorno angiogénico", y "trastorno angiogénico de la piel", se  
50 usan en referencia a un trastorno, generalmente un trastorno de la piel o trastorno relacionado que se produce como consecuencia de o que da como resultado un aumento de la vascularización en el tejido. A menudo, la etiología de la enfermedad angiogénica es desconocida. Sin embargo, si la angiogénesis es una causa real de un estado de enfermedad o es simplemente una dolencia del estado de enfermedad no tiene importancia, sino que la inhibición de la angiogénesis en el tratamiento o la reversión del estado de enfermedad o la dolencia es un aspecto importante de  
55 la presente invención. De esta manera, no se pretende que la presente invención esté limitada por ningún mecanismo de acción concreto. Los ejemplos de enfermedades angiogénicas de la piel que son adecuadas para el tratamiento que utilizan compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a psoriasis, acné, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas y linfangiogénesis, síndromes de Sturge-Weber, neurofibromatosis, esclerosis tuberosa, enfermedad inflamatoria crónica, y artritis. Ningún trastorno de la piel que tenga una caracterización  
60 primaria o secundaria, un aumento de la vascularización, se considera un trastorno angiogénico de la piel en la presente memoria descriptiva. De esta manera, los compuestos proporcionados por la presente invención encuentran uso en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades y/o dolencias.

- [0043]** El término “rosácea” se usa para describir acné, rosácea, o eritematoso caracterizado por dilatación vascular y folicular que implica normalmente la nariz y las porciones contiguas de las mejillas. La rosácea puede variar de un eritema muy leve pero persistente a una extensa hiperplasia de las glándulas sebáceas con pápulas y pústulas profundamente arraigadas y puede estar acompañada por telangiectasia y los sitios eritematosos 5 afectados. Esta dolencia se denomina también como “rosácea hipertrofica” o “rinofima” dependiendo de la gravedad de la dolencia. Se pretende que el término abarque todas las formas diversas de la dolencia.
- [0044]** El término “verruga” se usa para describir un crecimiento pequeño, normalmente duro, en la piel. Conocida también como “papiloma”, las verrugas son excrecencias de la piel del color de la carne que se caracterizan por 10 hipertrofia circunscrita de las papilas del corion, con engrosamiento de la granulación malpigia y de las capas de queratina de la epidermis. El papiloma vulgar, un subconjunto de verrugas o papilomas, se caracteriza por la infección de los queratinocitos con el virus del papiloma humano.
- [0045]** El término “psoriasis” se usa para describir una dolencia de la piel que se caracteriza por la erupción de 15 maculopápulas de escamas plateadas circunscritas, rojizas discretas y confluentes. Aunque no se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna zona corporal concreta, las lesiones psoriáticas se producen normalmente en los codos, rodillas, cuero cabelludo y tronco. Microscópicamente, estas lesiones demuestran una paraqueratosis característica y un alargamiento de los bordes del rete.
- [0046]** El término “acné” se usa para describir una dolencia de la piel caracterizada por erupciones inflamatorias 20 foliculares, papulares y postulares que implican el aparato sebáceo. Aunque existen numerosas formas de acné, la forma más común es conocida como acné simple o acné vulgar que se caracteriza por erupciones de la cara, parte superior de la espalda y pecho y está comprendida principalmente por comedones, quistes, pápulas y pústulas sobre una base inflamatoria. La dolencia se produce principalmente durante la pubertad y la adolescencia debido al 25 aparato sebáceo activo en exceso que se cree que se encuentra afectado por la actividad hormonal.
- [0047]** El término “eczema” es un término genérico usado para describir dolencias inflamatorias agudas o crónicas de la piel, normalmente eritematosas, edematosas, papulares, vesiculares y/o formación de costras. Estas dolencias 30 están seguidas a menudo por liquenificación, escamaduras y, ocasionalmente, por oscurecimiento del eritema y, de manera infrecuente, hiperpigmentación. El eczema está acompañado a menudo por la sensación de picor y quemazón. Se forman vesículas de eczema debido a la espongiosis intraepidérmica. El eczema se denomina algunas veces coloquialmente como “herpes”, “herpes seco”, y “herpes escamoso”. Existen numerosas subcategorías de eczema, todas las cuales se tratan por uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención. 35
- [0048]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “CK” seguido por un entero se refiere a un péptido específico. Se pueden encontrar secuencias peptídicas como las descritas en la presente memoria descriptiva (Véase por ejemplo, la Figura 1). Como ejemplo, CK37281 se refiere a la secuencia peptídica "ACYNLYGWTCGGG" 40 (SEQ ID NO: 1), tal como se muestra en la Figura 1.
- [0049]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, en algunas realizaciones, el “compuesto” comprende la proteína “completa” (es decir, en su longitud completa, como se produce en la naturaleza (o como mutada)), mientras que en otras realizaciones comprende una forma truncada de una proteína. De esta manera, en algunas 45 realizaciones, los compuestos de la presente invención están o bien truncados o son de “longitud completa”. Adicionalmente, en algunas realizaciones, el truncamiento se localiza en el extremo N, mientras que en otras realizaciones, el truncamiento se localiza en el extremo C terminal de la proteína. En realizaciones adicionales, los compuestos carecen de una o más porciones (*por ejemplo*, subsecuencias, secuencias señal, dominios o restos), tanto activos como no.
- [0050]** El término “organismo” se usa a lo largo de la memoria para describir un animal, preferiblemente un ser 50 humano, para quien es el tratamiento, incluyendo el tratamiento profiláctico, con el que se proporcionan los compuestos de acuerdo con la presente invención. Para el tratamiento de aquellas infecciones, dolencias o estados de enfermedad que son específicos de un animal específico tal como un paciente humano, el término organismo se refiere a este animal específico. 55
- [0051]** Las “células hospedadoras” usadas en la presente invención generalmente son hospedadores procariotas o eucariotas que contienen un vector de expresión y/o gen de interés. Las células hospedadoras se transforman o 60 transfectan con vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante. Dichas células hospedadoras transformadas son capaces tanto de replicar vectores que codifican las variantes de proteínas como de expresar la variante de proteína deseada. En el caso de vectores que codifican la forma pre o la prepro de la proteína variante, dichas variantes, cuando se expresan, se segregan normalmente a partir de la célula hospedadora en el medio de la célula hospedadora.

**[0052]** El término “cantidad eficaz” se usa a lo largo de la memoria para describir concentraciones o cantidades de compuestos de acuerdo con la presente invención que se pueden usar para producir un cambio favorable en la enfermedad o dolencia tratada, tanto si este cambio es el crecimiento del cabello como la prevención del crecimiento del cabello.

5

**[0053]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “compuesto de vitamina B<sub>3</sub>” significa un compuesto que tiene la fórmula:



10

en la que R es – CONH<sub>2</sub> (es decir, niacinamida), - COOH (es decir, ácido nicotínico) o – CH<sub>2</sub>OH (es decir, alcohol nicotínico), sus derivados; y las sales de cualquiera de los anteriores.

**[0054]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “no vasodilatante” significa que un éster no da como resultado comúnmente una respuesta de lavado visible tras la aplicación a la piel en las composiciones sujeto. Se contempla que la mayoría de la población general no experimentará una respuesta al lavado visible, aunque dichos compuestos pueden producir vaso dilatación no visible en el ojo desnudo.

**[0055]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “retinoide” incluye todos los análogos naturales y/o sintéticos de la Vitamina A y/o los compuestos de tipo retinol que poseen la actividad biológica de la Vitamina A en/sobre la piel, así como los isómeros y estereoisómeros geométricos de estos compuestos.

**[0056]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “bioactividad” se refiere a una relación de causa y efecto entre una composición y un sistema biológico. De esta manera, el término se usa por los expertos en la materia de la biotecnología y las ciencias biológicas como la frase que describe una relación de causa y efecto entre una composición molecular y la materia biológica viva (*por ejemplo*, tejido, células, etc.).

**[0057]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva como un nombre, el término “bioactivo” se refiere a una composición que presente bioactividad tras la administración a una materia biológica viva (*por ejemplo*, tejido, células, etc.). El término se usa de manera sinónima con “compuesto bioactivo”.

**[0058]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “goma de silicona” significa siliconas de elevado peso molecular que tienen un peso molecular promedio en exceso de aproximadamente 200.000 y preferiblemente entre aproximadamente 200.000 y aproximadamente 4.000.000. Se pretende que la definición abarque las gomas de polialquil y poliaril siloxano no volátiles.

**[0059]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “polipéptido se refiere a un compuesto preparado a partir de una única cadena de restos de aminoácidos unida por enlaces peptídicos. El término “proteína” en la presente memoria descriptiva puede ser sinónimo con el término “polipéptido” o puede referirse, además, a un complejo de uno o más polipéptidos. El significado exacto es el conocido por un experto en la materia.

**[0060]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “casete de expresión” y “vector de expresión” se refieren a las construcciones de ácido nucleico generadas de manera recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos especificados de ácidos nucleicos que permite la transcripción de un ácido nucleico concreto en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar a un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plásmido, virus, u otro fragmento de ácido nucleico. Normalmente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. El término “casete de expresión” se puede usar indistintamente en la presente memoria descriptiva con “construcción de ADN” y sus equivalentes gramaticales.

50

**[0061]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “vector” y “vector de clonación” se refieren a construcciones de ácidos nucleicos diseñadas para transferir secuencias de ácidos nucleicos en células.

**[0062]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “vector de expresión” se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogo en una célula extraña. Están comercialmente disponibles muchos vectores de expresión procariotas y eucariotas. La selección de los vectores de expresión apropiados está comprendida dentro de los conocimientos del experto en la materia.

55

- [0063]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “plásmido” se refiere a una construcción de ADN bicatenario (ds) circular usada como vector de clonación, y que forma un elemento genético extracromosómico autoreplicante en algunos eucariotas o integrado en los cromosomas hospedadores.
- 5 **[0064]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “expresión” se refiere al proceso por el cual un polipéptido se produce basándose en la secuencia de ácido nucleico del gen o del péptido sintético químico. El proceso incluye la transcripción y la traducción del gen para producir el polipéptido/proteína.
- [0065]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “gen” significa el segmento de ADN  
10 implicado en la producción de una cadena de polipéptido que puede incluir o no regiones que preceden o que siguen a la región de codificación.
- [0066]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “molécula de ácido nucleico” y “secuencia de ácido nucleico” incluyen secuencias de cualquier forma de ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitarse a  
15 moléculas de ARN, ADN y ADNc. Se entenderá que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican una proteína dada, además de proteínas mutantes.
- [0067]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “codón” se refiere a una secuencia de tres nucleótidos  
20 en una molécula de ADN o ARNm que representa la instrucción para la incorporación de un aminoácido específico en una cadena polipéptidica.
- [0068]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “puente disulfuro” o “enlace disulfuro” se refiere al enlace formado entre los átomos de azufre y restos de cisteína en un polipéptido o una proteína. En esta  
25 invención, un puente disulfuro o enlace disulfuro puede no producirse naturalmente e introducirse por medio de una mutación puntual.
- [0069]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “puente salino” se refiere al enlace formado entre restos aminoácidos con carga opuesta, en un polipéptido o proteína. En esta invención, un puente salino  
30 puede no producirse naturalmente e introducirse por medio de una mutación puntual.
- [0070]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, una “enzima” se refiere a una proteína o polipéptido que cataliza al menos una reacción química.
- 35 **[0071]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “actividad” se refiere a cualquier actividad asociada con una proteína particular, tal como una actividad enzimática asociada con una proteasa. En algunas realizaciones, la actividad es una actividad biológica. En otras realizaciones, la actividad abarca la unión de las proteínas a receptores que dan como resultado efectos medibles en la dirección 3’ (*por ejemplo*, la unión de VEGF con su receptor análogo). “Actividad biológica” se refiere a cualquier actividad que se podría atribuir normalmente a  
40 la proteína por un experto en la materia.
- [0072]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “proteasa” se refiere a una enzima que degrada los enlaces peptídicos.
- 45 **[0073]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “enlace peptídico” se refiere al enlace químico entre el grupo carbonilo de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido.
- [0074]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “natural” se refiere a una secuencia o a una proteína que es natural o que se produce naturalmente.  
50
- [0075]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “mutaciones puntuales” se refiere a un cambio en un único nucleótido de ADN, especialmente cuando este cambio da como resultado un cambio de secuencia en una proteína.
- 55 **[0076]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “mutante” se refiere a una versión de un organismo o proteína en el que la versión es diferente de la natural. El cambio puede efectuarse mediante procedimientos bien conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, mediante mutación puntual en la que la proteína resultante se puede denominar como mutante.
- 60 **[0077]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “mutagénesis” se refiere al proceso de cambiar una composición (*por ejemplo*, una proteína) a partir de una composición natural (*por ejemplo*, una proteína) en una composición mutante o variante (*por ejemplo*, una proteína).

**[0078]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “sustituido” y “sustituciones” se refiere a la(s) sustitución(es), de un resto aminoácido o base de ácido nucleico en una secuencia parental. En algunas realizaciones, la sustitución implica la sustitución de un resto o base que se produce naturalmente.

5 **[0079]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “modificación” y “modificar” se refiere a cualquier cambio(s) en una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitarse a deleciones, inserciones, interrupciones, y sustituciones. En algunas realizaciones, la modificación implica la sustitución de un resto o base que se produce naturalmente.

10 **[0080]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “porción funcional de un polipéptido secretado” y sus equivalentes gramaticales, se refiere a un polipéptido secretado truncado que retiene su capacidad de mantenerse en una configuración normal, si bien truncada. En algunas realizaciones, se contempla que normalmente pueden estar presentes suficientes restos de un dominio del polipéptido secretado para permitir mantenerse en su configuración normal de manera independiente del polipéptido deseado al cual se unen. Sin embargo, en la mayor  
15 parte de los casos, la porción del polipéptido secretado está correctamente plegada y da como resultado un aumento de la secreción en comparación con su ausencia. De manera similar, en la mayor parte de casos, el truncamiento del polipéptido secretado significa que la porción funcional retiene una función biológica. En una realización preferida, se usa el dominio catalítico de un polipéptido secretado, aunque se pueden usar otros dominios funcionales, por ejemplo, los dominios de unión del sustrato. Las realizaciones adicionalmente preferidas utilizan el dominio catalítico  
20 y toda o parte de la región enlazante.

**[0081]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “bucle” se refiere a una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, 3-20 aminoácidos, más preferiblemente 5-15 aminoácidos, incluso de manera más preferible 5-10 aminoácidos, y lo más preferible 7-9 aminoácidos, que conecta elementos estructurales de una proteína. Dichos  
25 elementos incluyen, pero no se limitan a láminas beta y elementos helicoidales y el bucle de conexión y la horquilla beta. En algunas realizaciones, el bucle se estabiliza adicionalmente mediante el uso de enlaces covalentes. En algunas realizaciones preferidas, los enlaces covalentes comprenden enlaces disulfuro, especialmente, como se proporcionan en la presente memoria descriptiva. En realizaciones alternativas, los bucles se estabilizan mediante el uso de otros medios, que incluyen, pero no se limitan a amidas, enlaces de hidrógeno, y/o puentes salinos. En la  
30 mayor parte de realizaciones, los bucles se localizan sobre la superficie de proteínas y pueden estar alterados, tal como se proporcionan en la presente memoria descriptiva, para conferir propiedades adicionales (por ejemplo, deseables) a las proteínas requisito.

**[0082]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “oligonucleótido” se refiere a una secuencia de  
35 nucleótidos corta, que se puede usar, por ejemplo, como un cebador en una reacción usada para crear proteínas mutantes.

**[0083]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen” y “un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que  
40 codifica un gen” significa una secuencia de ácido nucleico que comprende la región de codificación de un gen o, en otras palabras, la secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico. La región de codificación puede estar presente en cualquiera forma de un ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en forma de ADN, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario (es decir, la cadena de sentido directo) o bicatenario. Se pueden colocar elementos control adecuados tales como potenciadores/promotores, uniones de corte y empalme,  
45 señales de poliadenilación, etc., en estrecha proximidad con la región de codificación del gen si se necesita, para permitir el apropiado inicio de la transcripción y/o el correcto procesamiento del transcrito de ARN primario. Alternativamente, la región de codificación utilizada en los vectores de expresión de la presente invención puede contener potenciadores/promotores endógenos, uniones de corte y empalme, secuencias de intervención, señales de poliadenilación, etc., o una combinación de ambos elementos de control endógenos y exógenos.

50 **[0084]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “cebador” se refiere a un oligonucleótido, tanto si se produce naturalmente como en una digestión rigurosa purificada o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a la cadena de ácido nucleico (es decir, en  
55 presencia de nucleótidos y de un agente de inducción tal como la ADN polimerasa a una temperatura y pH adecuados). El cebador es preferiblemente monocatenario para la máxima eficacia en la amplificación, pero puede ser alternativamente bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata, en primer lugar, para separar sus cadenas antes de usarse para preparar los productos de extensión. Preferiblemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de  
60 extensión en presencia de un agente de inducción. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura, fuente del cebador y el uso del procedimiento.

**[0085]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “sonda” se refiere a un oligonucleótido (es

- decir*, una secuencia de nucleótidos), que se produce tanto naturalmente como en una digestión rigurosa o se produce sintéticamente, de manera recombinante o mediante amplificación de la PCR, que es capaz de hibridarse con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de las secuencias génicas particulares. Se contempla que cualquier sonda usada en la presente invención estará marcada con alguna “molécula indicadora”, de tal manera que sea detectable en cualquier sistema de detección, que incluye, pero que no se limita a enzima (*por ejemplo*, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en ELISA), sistemas fluorescentes, radioactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema o marca de detección particular.
- 10 **[0086]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “diana”, cuando se usa en referencia a la reacción en cadena de la polimerasa, se refiere a la región de ácido nucleico unida por los cebadores usados para la reacción en cadena de la polimerasa. Un “segmento” se define como una región de ácido nucleico dentro de la secuencia diana.
- 15 **[0087]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “reacción en cadena de la polimerasa” (“PCR”) se refiere al procedimiento bien conocido en la técnica (Véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.683.195 4.683.202, y 4.965.188), para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación Este procedimiento para amplificar la secuencia diana consiste en introducir un gran exceso de dos cebadores de oligonucleótidos en la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido por una secuencia precisa de ciclación térmica en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios con sus respectivas cadenas de la secuencia diana bicatenaria. Para efectuar la amplificación, se desnaturaliza la mezcla y a continuación los cebadores se hibridan con sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Tras la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa de tal manera que forman una nueva pareja de cadenas complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridación del cebador y extensión de la polimerasa se pueden repetir muchas veces (es decir, la desnaturalización, hibridación y extensión constituyen un “ciclo”; puede haber numerosos “ciclos”) para obtener una elevada concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina por las posiciones relativas de los cebadores entre sí, y por tanto, esta longitud es un parámetro controlable. En virtud del aspecto de repetición del proceso, el procedimiento se denomina como “reacción en cadena de la polimerasa” (a partir de ahora en la presente memoria descriptiva “PCR”). Debido a que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana llegan a ser las secuencias predominantes (en términos de concentración) en la mezcla, se dice que está “amplificada mediante la PCR”.
- 20 **[0088]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “producto de la PCR”, “fragmento de la PCR”, y “producto de amplificación” de los compuestos después de dos o más ciclos de las etapas de desnaturalización de la PCR, la hibridación y la extensión están completas. Estos términos abarcan el caso en el que ha habido amplificación de uno o más segmentos de una o más secuencias diana.
- 25 **[0089]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “reactivos de amplificación” se refiere a aquellos reactivos (desoxirribonucleótidos trifosfatos, tampón, etc.), necesarios para la amplificación excepto los cebadores, el molde de ácido nucleico y la enzima de amplificación. Normalmente, los reactivos de amplificación junto con otros componentes de la reacción se colocan y contienen en un reactor de la reacción (tubo de ensayo, micropocillo, etc.).
- 30 **[0090]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “RT-PCR” se refiere a la replicación y a la amplificación de las secuencias de ARN. En este procedimiento se acopla la transcripción inversa a la PCR, usando más a menudo un procedimiento enzimático en el que se emplea una polimerasa termoestable, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.322.770. En la RT-PCR, el molde de ARN se convierte en ADNc debido a la actividad de la transcriptasa inversa de la polimerasa, y a continuación se amplifica usando la actividad polimerizante de la polimerasa (*es decir*, como en otros procedimientos de la PCR).
- 35 **[0091]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “hibridación” se refiere al proceso por el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria mediante emparejamiento de bases, como se conoce en la técnica.
- 40 **[0092]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “rigor máximo” se refiere al nivel de hibridación que se produce normalmente a aproximadamente  $T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$  de la sonda); “rigor elevado” a aproximadamente  $5^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$ ; “rigor intermedio” a aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  a  $20^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$ , y “rigor bajo” a aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$ . Como un experto en la técnica entenderá, se puede usar una hibridación con rigor máximo para identificar o detectar secuencias idénticas de polinucleótidos mientras que se puede usar una hibridación con rigor intermedio o bajo para identificar secuencias homólogas de polinucleótidos.
- 45 **[0090]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “RT-PCR” se refiere a la replicación y a la amplificación de las secuencias de ARN. En este procedimiento se acopla la transcripción inversa a la PCR, usando más a menudo un procedimiento enzimático en el que se emplea una polimerasa termoestable, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.322.770. En la RT-PCR, el molde de ARN se convierte en ADNc debido a la actividad de la transcriptasa inversa de la polimerasa, y a continuación se amplifica usando la actividad polimerizante de la polimerasa (*es decir*, como en otros procedimientos de la PCR).
- 50 **[0091]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “hibridación” se refiere al proceso por el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria mediante emparejamiento de bases, como se conoce en la técnica.
- 55 **[0092]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “rigor máximo” se refiere al nivel de hibridación que se produce normalmente a aproximadamente  $T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$  de la sonda); “rigor elevado” a aproximadamente  $5^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$ ; “rigor intermedio” a aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  a  $20^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$ , y “rigor bajo” a aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$ . Como un experto en la técnica entenderá, se puede usar una hibridación con rigor máximo para identificar o detectar secuencias idénticas de polinucleótidos mientras que se puede usar una hibridación con rigor intermedio o bajo para identificar secuencias homólogas de polinucleótidos.
- 60 **[0092]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “rigor máximo” se refiere al nivel de hibridación que se produce normalmente a aproximadamente  $T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$  de la sonda); “rigor elevado” a aproximadamente  $5^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$ ; “rigor intermedio” a aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  a  $20^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$ , y “rigor bajo” a aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$ . Como un experto en la técnica entenderá, se puede usar una hibridación con rigor máximo para identificar o detectar secuencias idénticas de polinucleótidos mientras que se puede usar una hibridación con rigor intermedio o bajo para identificar secuencias homólogas de polinucleótidos.

**[0093]** Las frases “sustancialmente similar” y “sustancialmente idéntico” en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos significan normalmente que un polinucleótido o polipéptido comprende una secuencia que tienen al menos una identidad de la secuencia del 75%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90%, aún de manera más preferible un 95%, lo más preferible un 97%, algunas veces tanto como un 98% y 99% de identidad de la secuencia, en comparación con la secuencia de referencia (*es decir*, la natural). Se puede determinar la identidad de la secuencia usando programas conocidos como BLAST, ALIGN, y CLUSTAL usando parámetros normalizados (*Véase por ejemplo*, Altschul, y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 [1990]; Henikoff y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 [1989]; Karin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 [1993]; y Higgins y col., Gene 73: 237 - 244 [1988]). El software para llevar a cabo análisis BLAST está públicamente disponible mediante la información del National Center for Biotechnology. También, se pueden investigar las bases de datos usando FASTA (Pearson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 [1988]).

**[0094]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “restos equivalentes” se refiere a proteínas que comparten restos aminoácidos particulares. Por ejemplo, se pueden identificar restos equivalentes determinando la homología al nivel de la estructura terciaria de una proteína (*por ejemplo*, VEGF). Cuya estructura terciaria se ha determinado mediante cristalografía de rayos x. Los restos equivalentes se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un resto aminoácido particular de la proteína que tiene posibles restos equivalentes y la proteína de interés (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están comprendidos en 0,13 nm y preferiblemente 0,1 nm tras la alineación. La alineación se consigue después que el mejor modelo se ha orientado y situado para proporcionar el máximo solapamiento de las coordenadas atómicas de los átomos sin hidrógeno de la proteína de las proteínas analizadas. El modelo preferido es el modelo cristalográfico que proporciona el factor R más bajo de los datos de difracción experimental y la resolución más elevada disponible, determinada usando los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica de la cristalografía y la caracterización/análisis de proteínas.

**[0095]** En algunas realizaciones, la modificación se realiza preferiblemente en la “secuencia de ADN precursor” que codifica la secuencia de aminoácidos de la enzima precursora, pero puede ser mediante la manipulación de la proteína precursora. En el caso de los restos que no están conservados, la sustitución de uno o más aminoácidos está limitada a las sustituciones que producen una variante que tiene una secuencia de aminoácidos que no corresponde a una encontrada en la naturaleza. En el caso de restos conservados, dichas sustituciones no deben dar como resultado una secuencia que se produce naturalmente. Los derivados proporcionados por la presente invención incluyen además modificación(es) química(s) que cambian las características de la proteína.

**[0096]** En algunas realizaciones preferidas, el gen de la proteína está ligado en un plásmido de expresión apropiado. El gen de la proteína clonada se usa a continuación para transformar o transfectar una célula hospedadora con el fin de expresar el gen de la proteína. En algunas realizaciones, el plásmido se replica en los hospedadores, en el sentido que contiene los elementos bien conocidos necesarios para la replicación del plásmido o se puede diseñar el plásmido para integrarse en el cromosoma hospedador. Los elementos necesarios se proporcionan para una expresión génica eficaz (*por ejemplo*, un promotor unido de manera operable al gen de interés). En algunas realizaciones, estos elementos necesarios se suministran como el propio promotor homólogo si este se reconoce, (*es decir*, transcrito por el hospedador), un terminador de la transcripción (una región de poliadenilación de células hospedadoras eucariotas) que es exógeno o se suministra por la región terminadora endógena del gen de la proteína. En algunas realizaciones, se incluye también un gen de selección tal como un gen de resistencia a antibióticos que permite el mantenimiento continuo del cultivo de las células hospedadoras infectadas por plásmidos en medios que contienen agentes antimicrobianos.

**[0097]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” se refieren a enzimas bacterianas cada una de las cuales corta el ADN bicatenario a o cerca de la secuencia de nucleótidos específica.

**[0098]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “molécula de ADN recombinante” según se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a una molécula de ADN que está comprendida por segmentos de ADN unidos juntos por medio de técnicas biológicas moleculares.

**[0099]** El término “proteína recombinante” o “polipéptido recombinante”, tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a una molécula de proteína que se expresa a partir de una molécula de ADN recombinante.

**[0100]** El término “proteína natural”, tal como se usa en la presente memoria descriptiva indica que una proteína no contiene restos aminoácidos codificados por secuencias de vectores; esto es, que la proteína natural contiene solo aquellos aminoácidos que se encuentran en la proteína tal como se produce en la naturaleza. Se puede producir una proteína natural por medios recombinantes o se puede aislar a partir de una fuente que se produce naturalmente.

**[0101]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “porción” cuando hace referencia a una

proteína (como en “una porción de una proteína dada”) se refiere a fragmentos de esta proteína. Los fragmentos pueden variar de tamaño desde cuatro restos de aminoácidos a la secuencia completa del aminoácido menos un aminoácido.

5 **[0102]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “proteína de fusión” se refiere a una proteína quimérica que contiene la proteína de interés (*es decir*, VEGF y fragmentos del mismo) unida a un fragmento de proteína exógena (el compañero de fusión que consiste en una proteína no VEGF). En algunas realizaciones, el compañero de fusión aumenta la solubilidad de la proteína VEGF que, tal como se expresa en una célula hospedadora, puede proporcionar una etiqueta de afinidad para permitir la purificación de la proteína de fusión  
10 recombinante procedente de la célula hospedadora o del sobrenadante del cultivo, o de ambos. Si se desea, se puede eliminar la proteína de fusión de la proteína de interés (*es decir*, VEGF y/o fragmentos del mismo) mediante una variedad de medios enzimáticos o químicos conocidos en la técnica.

**[0103]** Los términos “en combinación operable”, “en orden operable”, y “unido de manera operable”, tal como se  
15 usa en la presente memoria descriptiva se refieren al enlace de secuencias de ácido nucleico de tal manera que se produce una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la transcripción de un gen dado y/o la síntesis de una molécula de proteína deseada. El término se refiere también al enlace de secuencias de aminoácidos de tal manera se produce una proteína funcional.

20 **[0104]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “región de codificación” cuando se usa en referencia a un gen estructural se refiere a las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos que se encuentran en el polipéptido nascente como resultado de la traducción de una molécula de ARNm. La región de codificación está unida, en eucariotas, en el lado 5’ por el triplete de nucleótidos “ATG” que codifica la metionina iniciadora en el lado 3’ mediante uno de los tres tripletes que especifican los codones de detención (*es decir*, TAA,  
25 TAG, TGA).

**[0105]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “gen estructural” se refiere a una secuencia de ADN que codifica el ARN o una proteína. En contraste, “genes reguladores” son genes estructurales que codifican productos que controlan la expresión de otros genes (*por ejemplo*, factores de transcripción).  
30

**[0106]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “purificado” o “purificar” se refiere a la eliminación de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, los polipéptidos VEGF o aVEGF recombinantes se expresan en células hospedadoras y los polipéptidos se purifican mediante la eliminación de las proteínas de la célula hospedadora; el porcentaje de polipéptidos VEGF o aVEGF recombinantes aumenta por tanto en la muestra.  
35

**[0107]** El término “aislado” cuando se usa en relación con un ácido nucleico, como en “un oligonucleótido aislado” o “polinucleótido aislado” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos un ácido nucleico contaminante que se asocia ordinariamente en su fuente natural. El ácido nucleico aislado es el mencionado presente en una forma o configuración que es diferente de la que se encuentra en la naturaleza. En  
40 contraste, los ácidos nucleicos no aislados como ácidos nucleicos tales como ADN y ARN se encuentran en el estado que existe en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada (*por ejemplo*, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula hospedadora en proximidad con los genes adyacentes; las secuencias de ARN, tales como la secuencia de ARNm específico que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con otros numerosos ARNm que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, el ácido nucleico aislado  
45 que codifica una proteína VEGF incluye, por medio de ejemplo, dicho ácido nucleico en células que expresan ordinariamente una proteína VEGF en la que el ácido nucleico tiene una localización cromosómica diferente de la de las células naturales, o está flanqueado de otra forma por una secuencia de ácido nucleico diferente de la que se encuentra en la naturaleza. El ácido nucleico, oligonucleótido, o polinucleótido aislado puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando un ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado se va a  
50 utilizar para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá en un mínimo la cadena de sentido directo o de codificación (*es decir*, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero puede contener las cadenas de sentido directo y de sentido contrario (*es decir*, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser bicatenario).

55 **[0108]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “composición cosmética” se refiere a composiciones que encuentran uso en los cosméticos. Se usa en la presente memoria descriptiva la definición del Food Drug and Cosmetic Act (FD&C Act). De esta manera, las composiciones cosméticas se definen por su uso pretendido, como artículos previstos para frotarse, verterse, rociarse, o pulverizarse en, introducirse en, o aplicarse de otra forma al cuerpo humano para limpiar, embellecer, promover el atractivo o alterar la apariencia. Estas composiciones  
60 proporcionan beneficios no terapéuticos y no están reguladas como composiciones farmacéuticas. Sin embargo, en algunas situaciones, las composiciones cosméticas se incorporan en las composiciones farmacéuticas para proporcionar beneficios cosméticos (*por ejemplo*, productos que tratan la piel o las enfermedades del cabello, pero que contienen también composiciones cosméticas para su coloración u otros beneficios. También, se pretende que

la presente invención abarque el uso de composiciones cosméticas en animales diferentes de los seres humanos.

**[0109]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “composiciones farmacéuticas” y “composiciones terapéuticas” se refieren a composiciones tales como fármacos que proporcionan beneficios médicos, más bien que únicamente beneficios cosméticos. En los Estados Unidos, las composiciones farmacéuticas y terapéuticas están aprobadas por la Food and Drug Administration para el tratamiento y/o la prevención de dolencias particulares.

**[0110]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “fármaco” se define como en su definición de la FD&C Act. De esta manera, los fármacos se definen como artículos previstos para el uso en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de la enfermedad, y artículos (diferentes de los alimentos) previstos para afectar la estructura o cualquier función del cuerpo del hombre u otros animales.

**[0111]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “beneficio cosmético” se refiere a un cambio cosmético deseado que es el resultado de la administración de la composición para el cuidado personal. Los beneficios cosméticos incluyen, pero no se limitan a mejoras en la dolencia de la piel, cabello, uñas, y la cavidad oral. En las realizaciones preferidas, se proporciona al menos un beneficio cosmético mediante el cuidado de la piel, el cuidado del cabello, el cuidado de las uñas, y las composiciones de maquillaje de la presente invención.

**[0112]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “composición para el cuidado de la piel” se refiere a las composiciones que se aplican a la piel con el fin de proporcionar propiedades beneficiosas, que incluyen, pero que no se limitan a minimizar las arrugas, eliminación de las arrugas, decoloración, coloración, suavizamiento de la piel, alisamiento de la piel, depilación, limpieza, etc. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la presente invención proporciona composiciones para el cuidado de la piel que mejoran el tomo de la piel. En estas realizaciones, la mejora comprende la disminución de las arrugas, el alisamiento de la textura de la piel, la modificación de la coloración de la piel, y otros beneficios cosméticos deseados.

**[0113]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “composición para el cuidado de la piel” se refiere a las composiciones que se aplican al cabello para proporcionar propiedades beneficiosas, tales como engrosamiento, adelgazamiento, coloración, decoloración, limpieza, acondicionamiento, ablandamiento, conformado, etc.

**[0114]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “composiciones de maquillaje” se refiere a preparaciones cosméticas que se usan para embellecer, cuidar, mantener, o aumentar la apariencia de un ser humano u otro animal. “composiciones de maquillaje” incluye, pero no se limita a composiciones cosméticas de coloración, tales como máscaras, lápices de labios, delineadores de labios, sombras de ojos, delineadores de ojos, carmines, polvos para la cara, bases de maquillaje, coloretes, y lacas de uñas.

**[0115]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “fase dispersa” se usa por los expertos en la técnica de la tecnología de emulsión como la fase que existe como pequeñas partículas o gotículas suspendidas y rodeadas por una fase continua. La fase dispersa se conoce también como fase “interna” o “discontinua”

**[0116]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “potenciadores de la penetración” se refiere a composiciones que facilitan la penetración a través de la barrera superior del estrato córneo en las capas profundas de la piel. Los ejemplos de potenciadores de la penetración incluyen, pero no se limitan a, propilenglicol, azona, etoxidiglicol, dimetilisosórbido, urea, etanol, dimetilsulfóxido, microemulsiones, liposomas, y nanoemulsiones.

**[0117]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “emulsificador” y “tensioactivo” se refieren a compuestos que dispersan y suspenden la fase dispersa dentro de la fase continua de un material. Los tensioactivos encuentran uso concreto en productos previstos para la piel y/o la limpieza del cabello. En realizaciones particulares, el término “tensioactivo(s)” se usa en referencia a agentes de superficie activa tanto si se usan como emulsionantes o con otros objetivos tensioactivos tales como para la limpieza de la piel.

### **Descripción detallada de la invención**

**[0118]** La presente invención proporciona péptidos y péptidos soportados tal como se define en las reivindicaciones para el tratamiento de enfermedades proliferativas. En realizaciones particularmente preferidas, la presente invención proporciona péptidos y péptidos soportados para el tratamiento de enfermedades de la piel, tales como rosácea. Los péptidos soportados de la presente invención son péptidos contra-VEGF, que se expresan sobre una proteína de armazón inhibidora de la proteasa. En algunas realizaciones más preferidas, las proteínas de armazón son BBI.

**[0119]** En algunas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona compuestos cosméticos y/o farmacéuticos tal como se define en las reivindicaciones, adecuados para mejorar la apariencia de la piel. La

presente invención proporciona además péptidos que bloquean la unión de VEGF. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el péptido se expresa en un armazón que es un inhibidor de la proteasa (por ejemplo, BBI, STI, o inhibidor de la quimotripsina Eglina). En algunas realizaciones más preferidas, el inhibidor de la proteasa es BBI.

5 **[0120]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos cosméticos y/o farmacéuticos para mejorar la apariencia de la piel que comprenden al menos un polipéptido o un péptido tal como se define en las reivindicaciones. El polipéptido o péptido se une a VEGF.

10 **[0121]** En algunas realizaciones, los compuestos comprenden al menos un péptido, mientras que en otras realizaciones, los compuestos comprenden al menos un polipéptido. En algunas realizaciones preferidas, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-7, y 17. En realizaciones preferidas adicionales, el péptido tiene una secuencia de unión conservada, siendo la secuencia XXLWPXWC (SEQ ID NO: 15). En algunas realizaciones preferidas, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 22-24.

15 **[0122]** En algunas realizaciones preferidas, el polipéptido tiene un peso molecular que está preferiblemente entre 500 Daltons y 30.000 Daltons, más preferiblemente entre 1000 Daltons y 10.000 Daltons, y lo más preferible entre 1500 Daltons y 8.000 Daltons.

20 **[0123]** Los compuestos encuentran uso en la mejora de la piel en un organismo (es decir, un sujeto) que tiene un trastorno de la piel. En algunas realizaciones preferidas, el trastorno de la piel es un trastorno angiogénico de la piel. En realizaciones preferidas adicionales, el trastorno de la piel es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en psoriasis, úlceras venosas, acné, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas y linfangiogénesis, etc. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el trastorno de la piel es rosácea.

25 **[0124]** En otras realizaciones preferidas, la presente invención proporciona compuestos cosméticos y/o farmacéuticos tal como se define en las reivindicaciones, para mejorar la apariencia de la piel. En estas realizaciones preferidas, los compuestos comprenden al menos un péptido o polipéptido y al menos un armazón inhibidor de la proteasa, expresándose el péptido o polipéptido en el armazón. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el al menos un péptido o polipéptido es un bucle. En otras realizaciones particularmente preferidas, el bucle está cerrado por un enlace disulfuro. El polipéptido o péptido se une a VEGF, y se expresa en un armazón que es un inhibidor de la proteasa (por ejemplo, BBI, STI, o inhibidor de la quimotripsina Eglina). N algunas realizaciones más preferidas, el inhibidor de la proteasa es BBI.

35 **[0125]** En algunas realizaciones preferidas, los compuestos comprenden además al menos un péptido. Preferiblemente, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-7, y 17. En algunas realizaciones, los compuestos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 22-24. Lo más preferible, los compuestos comprenden la SEQ ID NO: 22. En algunas realizaciones preferidas, el péptido tiene una secuencia de unión conservada, siendo la secuencia XXLWPXWC (SEQ ID NO: 15). El peso molecular del péptido está preferiblemente entre 500 Daltons y 45.000 Daltons, más preferiblemente entre 1000 Daltons y 12.000 Daltons, y lo más preferible entre 1500 Daltons y 10.000 Daltons. En algunas realizaciones preferidas, los compuestos comprenden al menos un polipéptido.

45 **[0126]** En algunas realizaciones preferidas, los compuestos son para usar en la mejora de la piel en un organismo (es decir, un sujeto) que tiene un trastorno de la piel. En realizaciones preferidas adicionales, el trastorno de la piel es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en psoriasis, úlceras venosas, acné, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas y linfangiogénesis, etc. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el trastorno de la piel es rosácea.

50 **[0127]** En otras realizaciones adicionales, la presente invención proporciona composiciones cosméticas y/o farmacéuticas que comprenden al menos un polipéptido o péptido, tal como se define en las reivindicaciones, y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. Preferiblemente, el compuesto está presente en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 5% en peso basándose en el peso total de la composición. También de manera preferible, el compuesto está presente en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5% en peso basándose en el peso total de la composición. La composición puede estar en la forma de un vehículo emulsificado, tal como una crema o loción nutritiva, un gel estabilizado o sistema de dispersión, un suero de tratamiento, un sistema de administración liposómica, un pack o mascarilla tópica, un sistema de limpieza basado en tensioactivos tal como un champú o gel líquido, una dispersión o emulsión en aerosol o para pulverización, un acondicionador del cabello o de la piel, un adyuvante para dar estilo, o un producto pigmentado tal como un maquillaje, así como otras preparaciones de maquillaje y cosméticas adecuadas. En algunas realizaciones, el vehículo es al menos preferiblemente uno seleccionado entre el grupo que consiste en agua, propilenglicol, etanol, propanol, glicerol, butilenglicol y polietilenglicol.

**[0128]** En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona aplicaciones para el tratamiento del cabello y/o la piel, así como aplicaciones para la cicatrización de heridas, el tratamiento de enfermedades proliferativas, etc. De esta manera, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos adecuados para la aplicación en/sobre seres humanos y otros animales.

5

**[0129]** En realizaciones preferidas adicionales, la presente invención se dirige a al menos un péptido o polipéptido, al menos un bucle y al menos un armazón, tal como se define en las reivindicaciones. Se encuentran bucles naturales flexibles sobre la superficie de la mayoría de módulos de proteínas y existen unos tramos cortos de aminoácidos que conectan regiones de estructura secundaria definida. Aunque los estudios cristalográficos y de

10

RMN (resonancia magnética nuclear) muestran que los bucles naturales están normalmente menos bien definidos que las hélices alfa y las láminas beta, su libertad de conformación está normalmente sustancialmente restringida en comparación con los péptidos libre. Por consiguiente, las actividades de unión de los bucles naturales en las proteínas difieren normalmente significativamente de los que corresponden a la secuencia lineal de aminoácidos. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún mecanismo específico.

15

**[0130]** Los bucles dados a conocer en la presente memoria descriptiva unen proteínas tales como VEGF (*por ejemplo*, VEGF-A). La unión del bucle a la proteína evita que la proteína se una a su diana. De esta manera, se piensa que las interacciones de unión están perturbadas por la unión del bucle a la proteína. Como resultado, la bioactividad puede alterarse como se desee. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada

20

**[0131]** También se dan a conocer en la presente memoria descriptiva, armazones para estabilizar los bucles. STI, BBI y Eglina C tienen bucles naturales que se unen e inhiben las proteasas. En algunas realizaciones, los bucles naturales de STI y BBI están sustituidos con los polipéptidos y/o péptidos tal como se define en las reivindicaciones.

25

Tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva, se pueden sustituir estas secuencias con inhibidores de cualquier VEGF, mientras que en otros casos, las secuencias se sustituyen con inhibidores de VEGF-A. En realizaciones adicionales, los bucles naturales de STI y BBI se sustituyen con secuencias que se han aislado usando diversas técnicas conocidas en la materia (*por ejemplo*, expresión en fagos) que son las proteínas de unión a VEGF tal como se define en las reivindicaciones. Tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva, un bucle natural se sustituye con un bucle que tiene de 3 a 20 aminoácidos de longitud, preferiblemente de 5 a 15 aminoácidos de longitud, y más preferiblemente de 5 a 10 aminoácidos de longitud. En casos alternativos, encuentran uso secuencias más largas, siempre que proporcionen unión y/o inhibición. Además, los péptidos adecuados para el uso como sustituciones del(de los) bucle(s) natural(es) pueden formar bucles constreñidos (*es decir*, un bucle formado por la presencia de un enlace disulfuro entre dos restos de cisteína). Tal como se da a

30

conocer en la presente memoria descriptiva, los péptidos pueden tener entre 7 y 9 aminoácidos de longitud.

**[0132]** Existen algunas ventajas de usar armazones para estabilizar secuencias peptídicas. En algunas realizaciones preferidas, la actividad biológica del péptido es mayor y/o modula eficazmente la función biológica como resultado de limitar la flexibilidad del péptido y reducir el coste entrópico de fijar la secuencia del polipéptido en la conformación bioactiva. Además, la información estructural obtenida mediante cristalografía de rayos x encuentra uso en guiar la maduración por afinidad. Además, en algunas realizaciones, la secuencia presentada en un armazón estructural es más resistente a la degradación proteolítica en diferentes aplicaciones biológicas. En otras realizaciones adicionales, la construcción quimérica se obtiene en gran cantidad en sistemas de expresión de bajo coste biológico para aplicaciones industriales.

35

**[0133]** BBI representa un tipo de armazones de proteínas cuya unión a las proteasas está mediada por un bucle natural expuesto que está fijo en una conformación estructural característica y que se ajusta en el sitio activo de una manera que se piensa que es similar a la de un sustrato (Laskowski y Kato, *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 593-626 [1980]; y Bode y Huber, *más arriba*). El bucle natural está constreñido frecuentemente por la presencia de puentes disulfuro y/o extensas redes de unión a hidrógeno que actúan para bloquear la estructura en la correcta estructura natural. La secuencia de este bucle determina la especificidad de la inhibición, que imita la especificidad de las proteasas por sus sustratos. Por ejemplo, la mayoría de inhibidores de la tripsina tienen Arg o Lys en su resto P1. Los inhibidores de la familia BBI tienen una red de puentes disulfuro conservados que ayuda a formar una estructura simétrica de dos dominios tricíclicos (Chen y *col.*, *más arriba*; Werner y Wemmer, *más arriba*; y Liu y *col.*, *más arriba*), que contienen cada uno un sitio de unión independiente a la serina proteasa. El bucle de unión natural está contenido en una región unida por puentes disulfuro formados entre restos de cisteína. La identidad del resto aminoácido en el sitio P1 de cada dominio es el principal determinante de la serina proteasa inhibida. Los dominios naturales poseen lisina o arginina para la tripsina, leucina o tirosina para la quimotripsina y alanina para la elastasa (Tsunogae y *col.*, *J. Biochem. (Tokio)* 100: 243-246 [1986]). Adicionalmente, la serina está muy conservada en la posición P'1 y la prolina en la posición P'3. Las regiones bucle naturales individuales son muy adecuadas para injertar el bucle de proteína de los péptidos constreñidos por la cisteína anteriormente identificada que se unen a las dianas selectivamente, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

50

55

60

**[0134]** Se han caracterizado numerosas isoformas de BBI. Por ejemplo, la secuencia DDESSKPCCDQCACTKSNNPPQCRCSMDRLNSCHSACKSCICALSYPAQCFCVDITDFCYEPCKPSEDDKEN (SEQ ID NO:25) proporciona la secuencia de aminoácidos del esqueleto de BBI descrito en la presente memoria descriptiva. Además, en algunas realizaciones, BBI está truncado tanto como 10 restos aminoácidos que se están eliminando de cualquiera de extremo N o C. Cualquiera de las isoformas descritas en la presente memoria descriptiva, así como de las adicionales conocidas en la técnica, encuentran uso como armazones en la presente invención.

**[0135]** La presente invención proporciona algunas ventajas sobre la creación de, por ejemplo, proteínas quiméricas. La transferencia de una proteína completa puede ser difícil cuando, por ejemplo, un dominio de la proteína de interés transporta más de una actividad biológica importante. Mantener una actividad (*por ejemplo*, interacciones dominio-dominio funcionalmente significativas) a la vez que se altera otra (*por ejemplo*, elevada afinidad de unión a un cofactor o receptor) puede ser problemático. La presente invención, tal como se indica en la presente memoria descriptiva, supera esta limitación, ya que en las realizaciones preferidas los bucles se transfieren, en vez de dominios completos.

**[0136]** Adicionalmente, en algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención comprenden al menos una mutación además de las que se muestran anteriormente que proporcionan que dichos compuestos sean como se define en las reivindicaciones. Otras mutaciones, tales como deleciones, inserciones, sustituciones, transversiones, transiciones e inversiones, en una o más localizaciones, tal como se menciona a partir de ahora en la presente memoria descriptiva, encuentran uso en la presente invención, con la condición de que los compuestos resultantes sean como se define en las reivindicaciones.

**[0137]** En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones comprenden también una sustitución conservativa que se puede producir como una sustitución similar por similar (*por ejemplo*, básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc.) en realizaciones adicionales, se proporcionan sustituciones no conservativas (*es decir*, de un tipo de resto a otro, o que implica alternativamente la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina, ácido diaminobutírico ornitina, norleucina ornitina, pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina).

**[0138]** En algunas realizaciones, las secuencias tienen también deleciones, inserciones y/o sustituciones de restos aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente.

**[0139]** En algunas realizaciones se hacen sustituciones de aminoácidos deliberadas sobre la base de similitud en las propiedades de los aminoácidos (por ejemplo, polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los restos) y es por tanto útil para el grupo de aminoácidos junto con los grupos funcionales. Se pueden agrupar los aminoácidos basándose solo en las propiedades de su cadena secundaria. Sin embargo, es más útil incluir también los datos de mutaciones. Los conjuntos de aminoácidos derivados de esta manera se conservan igualmente por razones estructurales. Estos conjuntos se pueden describir en la forma de un diagrama de Venn (Véanse por ejemplo, Livingstone y Barton, *Comput. Appl Biosci.*, 9: 745-756 [1993]; y (Taylor, *J. Theor. Biol.*, 119: 205-218 [1986]). En algunas realizaciones, se realizan sustituciones conservativas, de acuerdo por ejemplo con la siguiente tabla que describe un diagrama de Venn generalmente aceptado que describe el agrupamiento de aminoácidos.

Conjunto		Subconjunto	
Hidrófobo	FWYHKMILVAGC	Aromático	FWYH
		Alifático	I L V
Polar	WYHKREDCSTNQ	Cargado	HKRED
		Cargado positivamente	HKR
		Cargado negativamente	E D
Pequeño	VCAGSPTND	Muy pequeño	AGS

**[0140]** En algunas realizaciones, las secuencias variantes de aminoácidos de la presente invención incluyen también grupos separadores adecuados insertados entre cualquiera de dos restos de aminoácidos de la secuencia que incluyen grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo además de aminoácidos separadores tales como restos de glicina o β-alanina. Una forma adicional de variación implica la presencia de uno o más restos aminoácidos en forma peptóide.

**[0141]** En algunas realizaciones, las comparaciones de la homología encuentran uso en la identificación de secuencias homólogas que encuentran uso en la presente invención. Se pueden llevar a cabo comparaciones de la homología de manera visual, o más normalmente, o más usualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Los programas informáticos disponibles pueden calcular el porcentaje de

homología entre dos o más secuencias. Adicionalmente, se puede calcular el porcentaje de homología sobre secuencias contiguas (es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia un resto a la vez). Esto se denomina una alineación "sin hueco". Normalmente dichas alineaciones sin huecos se llevan a cabo solo sobre un número relativamente corto de restos.

**[0142]** Aunque es un procedimiento muy sencillo y consistente, falla en tener en cuenta que, por ejemplo, en una pareja de secuencias idéntica de otra manera, una inserción o delección producirá que los siguientes restos de aminoácidos se coloquen fuera de la alineación, dando como resultado de esta manera potencialmente una gran reducción en el % de homología cuando se lleva a cabo una alineación global. Por consiguiente, la mayoría de los procedimientos de comparación de secuencias se diseñan para producir las alineaciones óptimas que tienen en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar excesivamente la puntuación total de la homología. Esto se consigue insertando "huecos" en la alineación de la secuencia para procurar maximizar la homología local.

**[0143]** Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones por hueco" a cada hueco que se produce en la alineación, de tal manera que para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de la secuencia con tan pocos huecos como sea posible (es decir, reflejando la mayor relevancia entre las dos secuencias comparadas) conseguirá una puntuación mayor que una con muchos huecos. Se usan normalmente "costes de huecos afines" que cargan un coste relativamente elevado por la existencia de un hueco y una penalización más pequeña por cada resto posterior en el hueco. Este es uno de los sistemas de puntuación de huecos más comúnmente usado. Las elevadas penalizaciones de huecos producirán por supuesto alineaciones optimizadas con pocos huecos. La mayoría de los programas de alineación permite que se modifiquen las penalizaciones por huecos. Sin embargo, se prefiere usar valores por defecto cuando se usa dicho software para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

**[0144]** El cálculo del máximo % de homología, por consiguiente, requiere, en primer lugar, la producción de una alineación óptima, que tenga en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Véase, *por ejemplo*, Devereux y col., Nuc. Acids Res., 12: 387 [1984]). Los ejemplos de otros paquetes de software que pueden llevar a cabo las comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete FASTA de BLAST, y la suite GENWORKS de herramientas de comparación, todas las cuales son conocidas por los expertos en la técnica. BLAST y FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea. Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa GCG Bestfit. El paquete Sequence de BLAST 2 está también disponible para comparar las proteínas y las secuencias de nucleótidos.

**[0145]** Aunque se puede medir el porcentaje final de homología en términos de identidad, el propio procedimiento de alineación no se basa normalmente en una comparación de parejas a todo o nada. En vez de esto, se usa generalmente una matriz de puntuación con similitud escalada que asigna puntuaciones a cada comparación por parejas basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz comúnmente usado es la matriz BLOSUM62 – la matriz por defecto de la suite de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin usan generalmente tanto los valores por defecto públicos como una tabla aleatoria comparativa de símbolos que se suministra. Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

**[0146]** Alternativamente, se puede calcular el porcentaje de homologías usando la característica de alineación múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basándose en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Véase *por ejemplo*, Higgins and Sharp, Gene 73: 237-244 [1988]).

**[0147]** Una vez el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el porcentaje de homología, y más preferiblemente, el porcentaje de identidad de la secuencia. El software normalmente incluye esto como parte de la comparación de la secuencia y genera un resultado numérico.

**[0148]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva, así como sus complementos. En las realizaciones adicionales preferidas, la invención proporciona vectores que comprenden un compuesto, tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva, las células que comprenden el compuesto y los procedimientos de expresión del compuesto.

**[0149]** Aquellos expertos en la técnica apreciarán la relación entre las secuencias de ácidos nucleicos y las secuencias de polipéptidos, en particular, en lo que se refiere al código genético y a la degeneración de este código, y serán capaces de construir dichos ácidos nucleicos sin dificultad. Por ejemplo, un experto en la técnica es consciente de que cada sustitución de aminoácido en una secuencia puede ser de uno o más codones que codifican el aminoácido sustituto. De acuerdo con esto, es evidente que, dependiendo de la degeneración del código genético

con respecto al resto aminoácido particular, se pueden generar una o más secuencias de ácidos nucleicos que correspondan a la secuencia del polipéptido.

**[0150]** Se pueden realizar mutaciones en la secuencia de aminoácidos y en la secuencia de ácido nucleico mediante cualquiera de numerosas técnicas, como se conoce en la materia. En realizaciones particularmente preferidas, las mutaciones se introducen en secuencias parentales por medio de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando cebadores apropiados. En algunas realizaciones, las enzimas parentales están modificadas al nivel del aminoácido, mientras que en otras realizaciones, las enzimas están modificadas a nivel del ácido nucleico, con el fin de generar las secuencias descritas en la presente memoria descriptiva. Se describe en la presente memoria descriptiva la generación de compuestos introduciendo uno o más cambios de codón correspondientes en la secuencia de nucleótidos que codifica un compuesto. Se apreciará que los anteriores cambios de codón encontrarán uso en las diversas secuencias de ácidos nucleicos dadas a conocer en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, los cambios de secuencias se realizan en cualquiera de las secuencias homólogas descritas en la presente memoria descriptiva.

**[0151]** Tal como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones, el "compuesto" comprende la proteína "completa", (es decir, en su longitud completa como se produce en la naturaleza (o como mutada), mientras que en otras realizaciones comprende una forma truncada de una proteína. De esta manera, los compuestos de la presente invención son tanto truncados como de "longitud completa". Adicionalmente, en algunas realizaciones, el truncamiento se localiza en el extremo N, mientras que en otras realizaciones el truncamiento se localiza en el extremo C de la proteína. En realizaciones adicionales, el compuesto carece de una o más porciones (por ejemplo, subsecuencias, secuencias señal, dominios o restos), tanto activos como no.

**[0152]** En realizaciones adicionales más alternativas, las secuencias de nucleótidos que codifican los compuestos se preparan sintéticamente mediante procedimientos estándares establecidos (por ejemplo, el procedimiento de la fosforamidita descrito por Beucage y col., *Tetrahedr. Lett.*, 22: 1859-1869 [1981]; o el procedimiento descrito por Matthes y co., *EMBO J.*, 3: 801-805 [1984]). En el procedimiento de la fosforamidita, se sintetizan oligonucleótidos (por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN), purificados, hibridados, ligados y clonados en vectores apropiados.

**[0153]** Tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva, las secuencias de nucleótidos son tanto de origen genómico mixto como sintético, el origen del ADNc y sintético mixto y el origen del ADNc y genómico mixto, preparadas mediante fragmento ligantes del origen del ADNc sintético o genómico, de acuerdo con las técnicas normalizadas. Cada fragmento ligado corresponde a diversas partes de la secuencia completa de nucleótidos. Se puede preparar la secuencia de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, como se conoce en la técnica.

**[0154]** En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos descritas aquí y adecuadas para el uso en los procedimientos y composiciones descritos aquí incluyen dentro de las mismas nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica numerosos tipos diferentes de modificaciones en los oligonucleótidos. Estos incluyen, pero no se limitan a esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Sin embargo, no se pretende que la presente divulgación esté limitada a ningún procedimiento particular, ya que cualquier procedimiento conocido de los expertos en la técnica para modificar las secuencias de nucleótidos encuentra uso en la presente divulgación. En algunos casos, estas modificaciones se llevan a cabo con el fin de potenciar la actividad *in vivo* o la duración de la vida de las secuencias de nucleótidos.

**[0155]** Los polinucleótidos dados a conocer en la presente memoria descriptiva pueden encontrar uso en la producción de cebadores y/o sondas. De esta manera, se pueden usar secuencias de polinucleótidos para producir cebadores de la PCR, cebadores para otros procedimientos de amplificación tal como se conoce en la técnica, sondas marcadas y/o procedimientos de clonación. Estos cebadores, sondas y otros fragmentos pueden ser al menos 15, preferiblemente al menos 20, y en algunos casos, al menos 25, 30 o 40 nucleótidos. Adicionalmente, estos cebadores, sondas y fragmentos están abarcados por el término "polinucleótido".

**[0156]** Se pueden producir polinucleótidos tales como polinucleótidos y sondas de ADN de manera recombinante, mientras que en otros casos se producen sintéticamente. Estas secuencias se pueden clonar usando procedimientos normalizados. En general, se producen cebadores por medios sintéticos, que implican una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada, un nucleótido de una vez. Están fácilmente disponible en la materia las técnicas para llevar a cabo esto usando técnicas automatizadas.

**[0157]** Se pueden producir generalmente polinucleótidos más largos usando medios recombinantes, usando por ejemplo, técnicas de clonación mediante la PCR, como se conoce en la materia. En dichos casos, los cebadores se diseñan normalmente para contener sitios de reconocimiento de la enzima de restricción adecuada de tal manera que el ADN amplificado se puede clonar fácilmente en un vector de clonación adecuado. Preferiblemente, las

secuencias variantes son al menos tan biológicamente activas como las secuencias presentadas en la presente memoria descriptiva.

**[0158]** Se pueden proporcionar secuencias que sean complementarias con el compuesto o secuencias que sean capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos de los compuestos (incluyendo las secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria descriptiva), así como secuencias de nucleótidos que sean complementarias con las secuencias que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos de los compuestos (incluyendo las secuencias complementarias con las presentadas en la presente memoria descriptiva). Se dan a conocer secuencias de polinucleótidos que son capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria descriptiva en condiciones de intermedios para un rigor máximo.

**[0159]** Se dan a conocer secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos del compuesto de ácido nucleico, o su complemento, en condiciones de rigor (*por ejemplo*, 50°C y 0,2xSSC. Más preferiblemente, las secuencias de nucleótidos pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos del compuesto, o su complemento, en las condiciones de rigor más elevado (*por ejemplo*, 65°C y 0,1xSSC).

**[0160]** Puede ser deseable mutar la secuencia con el fin de preparar un compuesto. De acuerdo con esto, se pueden preparar mutantes a partir de los compuestos proporcionados en la presente memoria descriptiva. Se pueden introducir mutaciones usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados. Encuentran uso diversos procedimientos conocidos en la técnica (Véanse por ejemplo, Morinaga y col., *Biotechnol.*, 2: 646-649 [1984]; Nelson y Long, *Anal. Biochem.*, 180: 147-151 [1989]; y Sarkar y Sommer, *Biotechn.*, 8: 404-407 [1990]). Sin embargo, encuentran uso procedimientos adicionales.

**[0161]** Las secuencias usadas en los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser una secuencia recombinante (es decir, una secuencia que se ha preparado usando técnicas de ADN recombinante producido usando cualquier procedimiento conocido adecuado en la técnica).

**[0162]** Se dan a conocer en la presente memoria descriptiva vectores que comprenden el compuesto, células que comprenden el compuesto, y procedimientos de expresar el compuesto. Las secuencias de nucleótidos usadas en los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva pueden incorporarse en un vector replicable recombinante. Se puede usar el vector para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en la forma enzima, en y/o a partir de una célula hospedadora compatible. Se puede controlar la expresión usando secuencias control (*por ejemplo*, secuencias reguladoras). Se pueden secretar proteínas producidas por una célula hospedadora mediante la expresión de la secuencia de nucleótidos (*es decir*, en el medio de crecimiento), mientras que en otros casos, las proteínas están contenidas intracelularmente en el interior de la célula hospedadora. Se pueden diseñar secuencias de codificación para incluir secuencias señal que dirijan la secreción de las secuencias que codifican la sustancia a través de una membrana celular procarionta o eucariota particular. Se pueden incorporar polinucleótidos en un vector replicable recombinante.

**[0163]** Se puede usar el vector para replicar el ácido nucleico en una célula hospedadora compatible.

**[0164]** El vector que comprende la secuencia del polinucleótido se puede transformar en una célula hospedadora adecuada. Aunque encuentra uso cualquier hospedador adecuado, se pueden seleccionar los hospedadores a partir del grupo que consiste en células bacterianas, de levaduras, de insectos, fúngicas y de mamíferos.

**[0165]** Los compuestos y sus polinucleótidos se pueden expresar introduciendo un polinucleótido en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible, y haciendo crecer la célula hospedadora en condiciones que conduzcan aproximadamente a la replicación del vector. Se puede recuperar el vector a partir de la célula hospedadora.

**[0166]** El ácido nucleico del compuesto puede estar operativamente enlazado con elementos reguladores de la transcripción y la traducción, activos en la célula hospedadora. El ácido nucleico del compuesto puede también codificar una proteína de fusión que comprende al menos una secuencia señal (por ejemplo, la derivada del gen de la glucoamilasa de *Schwanniomyces occidentalis*, el factor  $\alpha$  que corresponde al tipo genético de *Saccharomyces cerevisiae* y la TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae*). El ácido nucleico del compuesto puede codificar una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a membrana.

**[0167]** El compuesto se puede expresar a los niveles deseados en un organismo hospedador usando un vector de expresión. Se contempla que encontrará uso cualquier vector de expresión que comprenda un ácido nucleico del compuesto que sea capaz de expresar el gen que codifica el ácido nucleico del compuesto en el organismo hospedador seleccionado. La elección del vector depende de la célula hospedadora en la que se va a introducir. De esta manera el vector puede ser un vector que se replica de manera autónoma (*es decir*, un vector que existe como

una entidad episómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, tal como, por ejemplo, un plásmido, un bacteriófago o un elemento episómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial). Alternativamente, en algunos casos, el vector se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto el cromosoma.

5

**[0168]** El vector de expresión puede incluir los componentes de un vector de clonación, que incluyen, pero que no se limitan a dichos componentes como un elemento que permite la replicación autónoma del vector en el organismo hospedador seleccionado y uno o más marcadores fenotípicamente detectables con objetivos de selección. El vector de expresión puede comprender además las secuencias de nucleótidos control que codifican un promotor, operador, sitio de unión a ribosoma, señal de inicio de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o uno o más genes activadores. Adicionalmente, el vector de expresión puede comprender una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos capaz de dirigir el compuesto a un orgánulo de la célula hospedadora tal como un peroxisoma o a un compartimento concreto de la célula hospedadora. Dicha secuencia directora incluye, pero no se limita a la secuencia SKL. Para la expresión en la dirección de las secuencias control, la secuencia de ácido nucleico que codifica el compuesto se enlaza de manera operable con las secuencias control de una manera apropiada con respecto a la expresión.

**[0169]** El polinucleótido en un vector se puede enlazar de manera operable con una secuencia control que sea capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de codificación por la célula hospedadora (es decir, el vector es un vector de expresión). Se pueden modificar las secuencias control (por ejemplo, mediante la adición de elementos adicionales reguladores de la transcripción) con el fin de hacer el nivel de transcripción dirigido por las secuencias control más sensible a los moduladores de la transcripción. Las secuencias control pueden comprender promotores.

**[0170]** En alguno de los vectores dados a conocer en la presente memoria descriptiva, la secuencia de ácido nucleico que codifica el compuesto se combina de manera operable con una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que tenga actividad de transcripción en el organismo hospedador de elección y se pueda derivar de genes que sean homólogos o heterólogos con el organismo hospedador. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos modificada, tal como los ácidos nucleicos del compuesto, en el hospedador bacteriano incluyen, pero no se limitan al promotor del operón *lac* de *E. coli*, los promotores del gen *dagA* de la agarasa de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de la  $\alpha$ -amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, el promotor *aprE* de *Bacillus subtilis*, los promotores del gen de la amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, los promotores del gen de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* y un promotor derivado de un promotor derivado de *Lactococcus* sp. que incluye el promotor P170. Cuando el gen que codifica el compuesto se expresa en especies bacterianas tales como *E. coli*, se puede seleccionar un promotor adecuado, por ejemplo, de un promotor de bacteriófago que incluye un promotor T7 y un promotor del fago lambda. Para la transcripción es una especie fúngica, los ejemplos de promotores útiles son los derivados de los genes que codifican la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, la proteína aspártica de *Rhizomucor miehei*, la  $\alpha$ -amilasa neutra de *A. niger*, la  $\alpha$ -amilasa estable ácida de *A. niger*, la glucoamilasa de *A. niger*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae*, y la acetamidasa de *A. nidulans*. Los ejemplos de promotores adecuados para la expresión en especies de levaduras incluyen, pero no se limitan a los promotores Gal 1 y Gal 10 de *Saccharomyces cerevisiae* y los promotores AOX1 o AOX2 de *Pichia pastoris*.

**[0171]** Los ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados son especies Gram positivas, que incluyen, pero no se limitan a miembros de las *Bacillaceae*, (por ejemplo., *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. lautus*, *B. megaterium* y *B. thuringiensis*), especies de *Streptomyces* (por ejemplo, *S. murinus* y *S. lividans*) bacterias acidolácticas (por ejemplo, *Lactococcus* spp. tales como *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus* spp. que incluye *Lactobacillus reuteri*; *Leuconostoc* spp.; *Pediococcus* spp.; y *Streptococcus* spp. Alternativamente, cepas de especies Gram negativas que pertenecen a las *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, *E. coli*) o miembros de las *Pseudomonadaceae* encuentran uso como las dadas a conocer en la presente memoria descriptiva.

**[0172]** Se puede seleccionar un organismo hospedador de levadura adecuado a partir de diversas especies de levaduras biotecnológicamente útiles, que incluyen, pero que no se limitan a *Pichia* sp., *Hansenula* sp o *Kluyveromyces*, *Yarrowinia*, *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *S. pombe*). Se pueden usar cepas de especies de levaduras metilotróficas de *Pichia pastoris* como organismo hospedador, mientras que en otros casos, el organismo hospedador es una especie de *Hansenula*. Los organismos hospedadores adecuados entre los hongos filamentosos incluyen especies de *Aspergillus* (por ejemplo, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. tubigenis*, *A. awamori* y *Aspergillus nidulans*). Alternativamente, encuentran uso cepas de especies de *Fusarium* (por ejemplo, *F. oxysporum*) y *Rhizomucor* (por ejemplo, *Rhizomucor miehei*) como organismo hospedador. Las cepas adicionales adecuadas incluyen, pero no se limitan a especies de *Thermomyces* y *Mucor*.

**[0173]** Se pueden usar células hospedadoras que comprenden polinucleótidos para expresar polipéptidos, tales

como los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva, fragmentos, homólogos, variantes o sus derivados. Las células hospedadoras se cultivan en condiciones adecuadas que permiten la expresión de las proteínas. La expresión de los polipéptidos puede ser constitutiva (*es decir*, los péptidos se producen continuamente), mientras que en otros casos, la expresión es inducible. En el caso de expresión inducible, la producción de la proteína se inicia cuando se requiere mediante la adición de una sustancia inductora al medio de cultivo (*por ejemplo*, dexametasona o IPTG). Se pueden extraer polipéptidos de las células hospedadoras mediante una variedad de técnicas conocidas en la materia, que incluyen la lisis enzimática, química, y/u osmótica y la perturbación física.

10 **[0174]** Se pueden producir polipéptidos de manera recombinante en cualquier sistema exento de células *in vitro* adecuado (Incluyendo los comercialmente disponibles), tal como el sistema de reticulocitos de conejo TnT™ (Promega).

**[0175]** En realizaciones preferidas adicionales, la presente invención proporciona composiciones cosméticas y/o farmacéuticas que comprenden al menos un polipéptido o péptido, tal como se define en las reivindicaciones, y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. Preferiblemente, el compuesto está presente en una cantidad de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 5% en peso, basándose en el peso total de la composición. También, de manera preferible, el compuesto está presente en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5% en peso basándose en el peso total de la composición. La composición puede estar en la forma de un vehículo emulsificado, tal como una crema o loción nutritiva, un gel estabilizado o sistema de dispersión, un tratamiento en suero, un sistema de administración liposómica, un pack o mascarilla tópica, un sistema de limpieza basado en tensioactivos tal como un champú o gel líquido, una dispersión o emulsión en aerosol o para pulverización, un acondicionador del cabello o para la piel, un adyuvante para dar estilo, o un producto pigmentado tal como un maquillaje. Preferiblemente el vehículo es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en agua, propilenglicol, etanol, propanol, glicerol, butilenglicol y polietilenglicol.

**[0176]** En algunas realizaciones liposómicas, los liposomas comprenden agua y uno o más ingredientes capaces de formar vesículas de bicapas de lípidos que pueden mantener uno o más ingrediente(s) funcionales o activos. Los ejemplos no limitantes de los ingredientes capaces de formar vesículas de bicapas de lípidos incluyen: fosfolípidos, fosfatidilcolina hidrogenada, lecitina, colesterol y esfingolípidos. Los liposomas preferidos incluyen, sin limitación: a) un liposoma 0003 lipóide (compuesto por agua y lecitina y glicerina); b) un liposoma 0300 lipóide (compuesto por agua y fosfatidilcolina); c) un liposoma 0111 lipóide (compuesto por agua, extracto de hojas de Ginkgo biloba, alcohol desnaturalizado, lecitina hidrogenada y colesterol); d) liposomas antiirritantes (compuesto por agua extracto de semillas de cola acuminata, bisabolol y fosfolípidos); e) liposomas de vitamina C y E (compuestos por agua, fosfolípidos, acetato de tocoferilo y palmitato de ascorbilo); f) liposomas reafirmantes (compuestos por agua, butilenglicol, extracto de fruta de pyrus malus (manzana), fosfolípidos, acetato de tocoferilo y carbómero); y g) liposomas humectantes (compuestos por agua, PCA de sodio, acetato de tocoferilo, goma xantana, arginina, lisina, glicina y prolina).

**[0177]** Los ejemplos no limitantes de ingredientes funcionales o activos que se pueden administrar mediante liposomas incluyen: vitaminas y sus derivados, antioxidantes, proteínas y péptidos, agentes queratolíticos, bioflavonoides, terpenoides, fitoquímicos, y extractos de plantas, de origen marino o fermentadas. En una realización preferida, la composición comprende además un agente para el cuidado de la piel o un agente para el cuidado activo del cabello. Los ingredientes activos pueden incluir cualquiera de una amplia variedad de ingredientes tales como los conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, McCutcheon's Functional Materials, North American and International Editions, (2003), publicado por MC Publishing Co.). Preferiblemente, dichos ingredientes activos incluyen, pero no se limitan a antioxidantes, tales como derivados de tocoferilo y ascorbilo, bioflavonoides, terpenoides, compuestos sintéticos y similares, vitaminas y derivados de vitaminas, ácidos hidroxílicos y polihidroxílicos y sus derivados, tales como AHA y BHA y sus productos de reacción, péptidos y polipéptidos y sus derivados, tales como glicopéptidos y péptidos liofilizados, proteínas de choque térmico y citocinas, enzimas e inhibidores de enzimas y sus derivados, tales como proteasas, inhibidores de MMP, catalasas, glucosa oxidasa y superóxido dismutasa, aminoácidos y sus derivados, productos de fermentación bacteriana, fúngica y de levadura y sus derivados, incluyendo hongos, algas y algas marinas y sus derivados, fitoesteroles y extractos de plantas y de partes de plantas y sus derivados y fosfolípidos y sus derivados, agentes anticasma tales como piritona de cinc y los sistemas de administración que los contienen, tal como se proporcionan en la presente memoria descriptiva y/ se conoce en la técnica.

**[0178]** En algunas realizaciones preferidas, el agente activo para el cuidado de la piel se selecciona entre el grupo que consiste en un componente de la vitamina B3, pantenol, vitamina E, acetato de vitamina E, retinol, propionato de retinilo, palmitato de retinilo, ácido retinoico, vitamina C, teobromo, alfa-hidroxiácido, farnesol, fitrantriol, ácido salicílico, palmitil pentapéptido-3 y sus mezclas. En algunas realizaciones preferidas, el componente de vitamina B3 es niacinamida. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente memoria descriptiva comprenden un agente activo para el cuidado de la piel a un nivel entre aproximadamente 0,0001% y aproximadamente 20%, preferiblemente entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 5%, más

preferiblemente entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 2% en peso.

**[0179]** Los derivados a modo de ejemplo de los compuestos de vitamina B<sub>3</sub> anteriores incluyen ésteres de ácido nicotínico, que incluyen ésteres no vasodilatadores de ácido nicotínico, nicotinil aminoácidos, ésteres de alcohol nicotínico de ácidos carboxílicos, ácido N-óxido nicotínico y N-óxido niacinamida. Los ésteres adecuados de ácido nicotínico incluyen ésteres de ácido nicotínico de C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>, más preferiblemente alcoholes C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. En estas realizaciones, los alcoholes son de cadena lineal o de cadena ramificada de manera adecuada, cíclicos o acíclicos, saturados o insaturados (incluyendo aromáticos), y sustituidos o sin sustituir. Los ésteres son preferiblemente no vasodilatadores.

**[0180]** Los ésteres no vasodilatadores de ácido nicotínico incluyen nicotinato de tocoferol y hexanicotinato de inositol, se prefiere nicotinato de tocoferol. Se proporciona una descripción más completa de los compuestos de la vitamina B<sub>3</sub> en el documento WO 98/22085. Los compuestos de la vitamina B<sub>3</sub> preferidos incluyen niacinamida y nicotinato de tocoferol.

**[0181]** En realizaciones adicionales, el agente activo para el cuidado de la piel comprende al menos un retinoide. El retinoide es preferiblemente retinol, ésteres de retinol (*por ejemplo*, alquil ésteres C<sub>2</sub> – C<sub>22</sub> de retinol, que incluyen palmitato de retinilo, acetato de retinilo, propionato de retinilo) retinal, y/o ácido retinoico (incluyendo todos los ácidos trans retinoicos y/o el ácido 13-cis-retinoico), retinoides más preferibles diferentes del ácido retinoico: Se conocen bien en la técnica estos compuestos y están comercialmente disponibles de numerosas fuentes (*por ejemplo*, Sigma y Boehringer Mannheim). Los retinoides preferidos incluyen retinol, palmitato de retinilo, acetato de retinilo, propionato de retinilo, retinal, ácido retinoico y sus combinaciones. Más preferidos son el retinol, propionato de retinol, ácido retinoico y palmitato de retinilo. En algunas realizaciones, el retinoide se incluye como un material sustancialmente puro, mientras que en otras realizaciones, se proporciona como un extracto obtenido mediante aislamiento físico y/o químico adecuado a partir de fuentes naturales (*por ejemplo*, plantas). Cuando se incluye un retinoide en las composiciones en la presente memoria descriptiva, comprende preferiblemente entre aproximadamente 0,005% y aproximadamente 2%, preferiblemente entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 1% de retinoide. Retinol se usa preferiblemente en una cantidad de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,15%; los ésteres de retinol se usan preferiblemente en una cantidad de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 2% (*por ejemplo*, aproximadamente 1%).

**[0182]** En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención comprenden cantidades seguras y eficaces de un vehículo dermatológicamente aceptable que es adecuado para la aplicación tópica a la piel o al cabello dentro de los materiales esenciales y se incorporan otros materiales opcionales para permitir a los materiales esenciales y componentes opcionales administrarse a la piel o al cabello en una concentración apropiada. De esta manera, en algunas realizaciones, el vehículo actúa como diluyente, dispersante, disolvente o similar de los componentes esenciales, asegurando que estos componentes se puedan aplicar y distribuir uniformemente sobre la diana seleccionada a una concentración apropiada.

**[0183]** En realizaciones adicionales, una cantidad eficaz de uno o más compuestos descritos en la presente memoria descriptiva se incluye también en las composiciones que se van a aplicar a materiales queratinosos, tales como uñas y cabello, incluyendo, pero sin limitarse a aquellas útiles como composiciones para pulverización del cabello, composiciones para dar estilo al cabello, composiciones para administrar champú y/o acondicionamiento al cabello, composiciones aplicadas con el objetivo de regulación del crecimiento del cabello y composiciones aplicadas al cabello y al cuero cabelludo con el objetivo de tratar la seborrea, la dermatitis y/o la caspa.

**[0184]** En otras realizaciones adicionales, una cantidad eficaz de uno o más compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva se incluye en las composiciones adecuadas para la aplicación tópica a la piel o al cabello. Estas composiciones se proporcionan en cualquier forma adecuada, que incluye, pero sin limitarse a cremas, lociones, geles, suspensiones, dispersiones, microemulsiones, nanodispersiones, microesferas, hidrogeles, emulsiones (*por ejemplo*, aceite en agua y agua en aceite, así como emulsiones múltiples), y geles multilaminares y similares (*Véase por ejemplo*, Schlossman y col., *The Chemistry and Manufacture of Cosmetics*, [1998]). En algunas realizaciones, las composiciones se formulan como composiciones acuosas o de silicona, mientras que en otras realizaciones, se formulan como emulsiones de una o más fases oleosas en una fase continua acuosa (o una fase acuosa en una fase oleosa).

**[0185]** El tipo de vehículo utilizado en la presente invención depende del tipo de forma deseada del producto de la composición. El vehículo puede ser sólido, semisólido o líquido. Los vehículos adecuados incluyen líquidos, semisólidos (*por ejemplo*, cremas, lociones, geles, barras, pomadas, y pastas), pulverizadores y nebulizadores para la nariz. Preferiblemente el vehículo está en la forma de una loción, crema o un gel, más preferiblemente, uno que tenga un espesor suficiente o punto de rendimiento para evitar la sedimentación de las partículas. En algunas realizaciones, el vehículo es inerte, mientras que en otras realizaciones, este proporciona beneficios dermatológicos. En algunas realizaciones, el vehículo se aplica directamente a la piel y/o al cabello, mientras que en otras

realizaciones, se aplica mediante una toallita o paño tejido o no tejido. En otras realizaciones adicionales, está en forma de una almohadilla, mascarilla o envoltorio. En otras realizaciones adicionales, está en forma de aerosol o pulverizado o bombeado de otra forma sobre la piel y/o el cabello. El vehículo escogido es física y químicamente compatible con los componentes esenciales descritos en la presente memoria descriptiva y no debe afectar excesivamente a la estabilidad, eficacia u otros usos beneficiosos asociados con las composiciones de la presente invención.

**[0186]** Los vehículos preferidos contienen un diluyente hidrófilo dermatológicamente aceptable. Los diluyentes hidrófilos adecuados incluyen agua, diluyentes hidrófilos orgánicos tales como alcoholes monohídricos  $C_2 - C_{10}$ , preferiblemente  $C_2 - C_6$ , preferiblemente,  $C_3 - C_6$  y los glicoles y polioles de bajo peso molecular, que incluyen propilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol, butilenglicol, 1,2,4-butanotriol, ésteres de sorbitol, 1,2,6-hexametriol, pentilenglicol, hexilenglicol, ésteres de sorbitol, éteres etoxilados, éteres propoxilados, y sus combinaciones. El diluyente es preferiblemente líquido. El agua es un diluyente preferido. La composición comprende preferiblemente al menos aproximadamente un 20% del diluyente hidrófilo.

**[0187]** En algunas realizaciones, los vehículos adecuados comprenden también una emulsión que comprende una fase hidrófila, especialmente una fase acuosa, y una fase hidrófoba (por ejemplo, un lípido o un material oleoso). Como conocen bien los expertos en la técnica, la fase hidrófila está dispersa en la fase hidrófoba, o viceversa, para formar fases continuas y dispersas hidrófilas o hidrófobas, respectivamente, dependiendo de la composición de los ingredientes. El término "fase dispersa" es un término bien conocido por un experto en la materia de la tecnología de emulsiones, usado en referencia a la fase que existe como pequeñas partículas o gotículas que están suspendidas y rodeadas por una fase continua. La fase dispersa es también conocida como la fase interna o discontinua. La emulsión puede ser o comprender (por ejemplo, en una triple emulsión o en otra emulsión multifase) una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite como una emulsión de agua en silicona. Las emulsiones de aceite en agua comprenden normalmente entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 60% (preferiblemente aproximadamente un 1% a aproximadamente un 30%) de la fase hidrófoba dispersa y entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 99% (preferiblemente entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 90%) de la fase hidrófila continua, mientras que las emulsiones de agua en aceite comprenden normalmente entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 98% (preferiblemente entre aproximadamente un 40% y aproximadamente un 90%) de la fase hidrófila dispersa y entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 50% (preferiblemente aproximadamente un 1% a aproximadamente un 30%) de la fase hidrófoba continua.

**[0188]** En realizaciones adicionales, el vehículo incluye también uno o más componentes que facilitan la penetración a través de la barrera de estrato córneo superior a los niveles inferiores de la piel. Los ejemplos de potenciadores de la penetración incluyen, pero no se limitan a, propilenglicol, azona, etoxidiglicol, isosórbido de dimetilo, urea, etanol y dimetil sulfóxido, así como microemulsiones, liposomas y nanoemulsiones.

**[0189]** En algunas realizaciones adicionales, las composiciones de la presente invención comprenden humectantes que están presentes preferiblemente a un nivel de entre aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20%, preferiblemente entre aproximadamente 0,1% a aproximadamente 15% y preferiblemente entre aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10%. Los humectantes preferidos incluyen, pero no se limitan a, compuestos seleccionados entre alcoholes polihídricos, sorbitol, glicerol, urea, betaína, D-pantenol, DL-pantenol, Pantoneato de calcio, jalea real, pantetina, pantoteína, pantenil etil éter, ácido pangámico, piridoxina, complejo de pantoil lactosa vitamina B, pirrilidona de sodio, ácido carboxílico, hexano - 1, 2, 6, - triol, guanidina o sus derivados, y sus mezclas.

**[0190]** Los alcoholes polihídricos adecuados para su uso en la presente memoria descriptiva incluyen, pero no se limitan a polialquilenglicoles y preferiblemente alquilenpolioles y sus derivados, incluyendo propilenglicol, dipropilenglicol, polipropilenglicol, polietilenglicol y sus derivados, sorbitol, hidroxipropilsorbitol, eritritol, treitol, pentaeritritol, xilitol, glucitol, manitol, pentilenglicol, hexilenglicol, butilenglicol (por ejemplo, 1,3-butilenglicol), hexanotriol (por ejemplo, 1,2,6-hexanotriol), trimetilolpropano, neopentilglicol, glicerina, glicerina etoxilada, propano-1,3 diol, glicerina propoxilada y sus mezclas. Los derivados alcoxilados de cualquiera de los anteriores alcoholes polihídricos son también adecuados para su uso en la presente memoria descriptiva. Los alcoholes polihídricos preferidos de la presente invención se seleccionan entre glicerina, butilenglicol, propilenglicol, pentilenglicol, hexilenglicol, dipropilenglicol, polietilenglicol, hexanotriol, glicerina etoxilada y glicerina propoxilada y sus mezclas.

**[0191]** Los humectantes adecuados útiles en la presente memoria descriptiva son sodio 2-pirrolidona-5-carboxilato (NaPCA), guanidina; ácido glicólico, y sales de glicolato (*por ejemplo*, amonio y alquilamonio cuaternario); ácido láctico y sales de lactato (*por ejemplo*, amonio y alquilamonio cuaternario); aloe vera en cualquiera de su variedad de formas (*por ejemplo*, gel de aloe vera); ácido hialurónico y sus derivados (*por ejemplo*, derivados salinos tales como hialuronato de sodio); lactamida monoetanolamina; acetamida monoetanolamina; urea; betaína, pantenol y sus derivados; y sus mezclas.

- [0192]** En algunas realizaciones, al menos parte (hasta aproximadamente un 5% en peso de la composición) de un humectante se incorpora en las composiciones de la presente invención en la forma de una premezcla con un copolímero de acrilato o metacrilato hidrófobo reticulado particulado, presente por sí mismo preferiblemente en una cantidad de entre aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10% que se puede añadir tanto a la fase acuosa como a la dispersa. Este copolímero es particularmente valioso para reducir el brillo y controlar el aceite mientras ayuda a proporcionar unos beneficios de humectación eficaces y se describe adicionalmente en detalle en el documento WO96/03964.
- [0193]** En algunas realizaciones, las composiciones de aceite en agua y de agua en aceite de la presente invención comprenden entre aproximadamente un 0,05% a aproximadamente un 20%, preferiblemente entre aproximadamente un 7% a aproximadamente un 15%, preferiblemente entre aproximadamente un 2% a aproximadamente un 10%, preferiblemente entre aproximadamente un 2% a aproximadamente un 5% de un emoliente dermatológicamente aceptable. Los emolientes tienden a lubricar la piel, aumentan la tersura y la elasticidad de la piel, evitan o alivian la sequedad de la piel y/o protegen la piel. Los emolientes con normalmente inmiscibles en agua, los materiales oleosos o cerosos y los emolientes pueden conferir propiedades estéticas a una composición tópica. Se conocen una amplia variedad de emolientes adecuados (Véanse por ejemplo, Sagarin, *Cosmetics, Science and Technology*, 2ª Edición, Vol. 1, pp. 32-43 [1972]; y documento WO 00/24372), y encuentran uso en la presente memoria descriptiva, que contiene numerosos ejemplos de materiales adecuados como emolientes. Los emolientes adicionales incluyen, pero no se limitan a los siguientes:
- i) Hidrocarburos de cadena lineal y ramificada que tienen entre aproximadamente 7 y aproximadamente 40 átomos de carbono, tales como aceites minerales, dodecano, escualeno, colesterol, poliisobutileno hidrogenado, isohexadecano, isoeicosano, isooctahexacontano, isohexapentacontahectano, y las isoparafinas C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>, que son hidrocarburos ramificados C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>. Los hidrocarburos de cadena ramificada adecuados para su uso en la presente memoria descriptiva se seleccionan entre isopentacontaoctactano, vaselina y sus mezclas;
  - ii) ésteres de ácidos grasos C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> de ácidos carboxílicos C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, alquil benzoatos C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub> de ácidos dicarboxílicos C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, por ejemplo, isononanoato de isononilo, neopentanoato de isoestearilo, octanoato de isodecilo, isononanoato de isodecilo, isononanoato de tridecilo, octanoato de miristilo, pelargonato de octilo, isononanoato de octilo, miristato de miristilo, neopentanoato de miristilo, octanoato de miristilo, miristato de isopropilo, propionato de miristilo, estearato de isopropilo, isoestearato de isopropilo, isoestearato de metilo, behenato de behenilo, maleato de dioctilo, adipato de diisopropilo, y dilinoletao de diisopropilo y sus mezclas y encuentran también uso en la presente invención;
  - iii) mono y poliésteres C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> de azúcares y materiales relacionados. Estos ésteres se derivan de un resto azúcar o poliol y uno o más restos de ácido carboxílico. Dependiendo del constituyente ácido y del azúcar, estos ésteres pueden estar tanto en forma líquida como sólida a temperatura ambiente. Los ejemplos incluyen: tetraoleato de glucosa, los tetraésteres de galactosa del ácido oleico, el tetraoleato de sorbitol, el tetraoleato de sacarosa, el pentaoleato de sacarosa, el hexaoleato de sacarosa, el heptaoleato de sacarosa, el octaoleato de sacarosa, el hexaéster de sorbitol. Otros materiales incluyen los ésteres de ácidos grasos de sacarosa del aceite de semillas de algodón o del aceite de soja. Se describen otros ejemplos de dichos materiales en el documento WO 96/16636;
  - iv) Aceites vegetales y aceites vegetales hidrogenados. Los ejemplos de aceites vegetales y aceites vegetales hidrogenados incluyen aceite de cártamo, aceite de semillas de uva, aceite de coco, aceite de semillas de algodón, aceite de menhaden, aceite de palmiche, aceite de palma, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de colza, aceite de linaza, aceite de fibra de arroz, aceite de pino, aceite de nueces, aceite de sésamo, aceite de semillas de girasol, aceites parcial y completamente hidrogenados de las anteriores fuentes y sus mezclas;
  - v) Agentes humectantes solubles o coloidalmente solubles. Los ejemplos incluyen ácido hialurónico y sulfato de condroitina.
- [0194]** En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención contienen un emulsionante y/o tensioactivo, generalmente para ayudar a dispersar y suspender la fase dispersa dentro de la fase acuosa continua. Un tensioactivo puede ser también útil si se pretende el producto para la limpieza de la piel o el cabello. Por conveniencia a partir de ahora en el presente documento, "emulsionantes" están abarcados por el término "tensioactivos". De esta manera, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "tensioactivo(s)" se refiere a agentes de superficie activa tanto si se usan como emulsionantes como para otros objetivos tensioactivos tales como la limpieza de la piel. Los tensioactivos conocidos, que incluyen los tensioactivos convencionales encuentran uso en la presente invención, con la condición de que el agente seleccionado sea química y físicamente compatible con los componentes esenciales de la composición y proporcione las características deseadas (Véase por ejemplo, documento 00/24372). Los tensioactivos adecuados incluyen materiales derivados sin silicona, materiales derivados de silicona, y sus mezclas.
- [0195]** En realizaciones adicionales, la composiciones de la presente invención comprenden preferiblemente entre aproximadamente 0,05% a aproximadamente 30%, más preferiblemente entre aproximadamente 0,5% y 15%, y lo más preferible entre aproximadamente 1% y 10% de un tensioactivo o mezcla de tensioactivos. El tensioactivo

exacto o mezcla de tensioactivos escogida depende del pH de la composición, los otros componentes presentes y los productos estéticos finales deseados.

**[0196]** Entre los tensioactivos no iónicos que son útiles en la presente memoria descriptiva están aquellos que se pueden definir ampliamente como productos de condensación de alcoholes de cadena larga (por ejemplo, alcoholes  $C_{8-30}$ ), con azúcar o polímeros de almidón (por ejemplo, glicósidos) Otros tensioactivos no iónicos útiles incluyen los productos de condensación de óxidos de alquileo con ácidos grasos (es decir, ésteres de óxido de alquileo de ácidos grasos). Estos materiales tienen la fórmula general  $RCO(X)_nOH$  en la que R es un grupo alquilo  $C_{10-30}$ , X es  $-OCH_2CH_2-$  (es decir, derivado de etilenglicol u óxido) u  $-OCH_2CHCH_3-$  (es decir, derivado de propilenglicol u óxido) y n es un entero entre aproximadamente 6 y aproximadamente 200. Otros tensioactivos no iónicos son los productos de condensación de los óxidos de alquileo con 2 moles de ácidos grasos (es decir, diésteres de óxido de alquileo de ácidos grasos). Estos materiales tienen la fórmula general  $RCO(X)_nOOCR$  en la que R es un grupo alquilo  $C_{10-30}$ , X es  $-OCH_2CH_2-$  (es decir, derivado de etilenglicol u óxido) u  $-OCH_2CHCH_3-$  (es decir, derivado de propilenglicol u óxido) y n es un entero entre aproximadamente 6 y aproximadamente 100. En algunas realizaciones, un emulsionante para su uso en la presente memoria descriptiva es preferiblemente una mezcla de éster de ácido graso basada en una mezcla de éster de ácido graso de sorbitán y éster de ácido graso de sacarosa, especialmente una mezcla de estearato de sorbitán y cocoato de sacarosa. Los ejemplos adecuados adicionales incluyen una mezcla de alcoholes de cetearilo y glucósidos de cetearilo. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a cualquier emulsionante particular, ya que se conocen en la técnica diversos emulsionantes adecuados.

**[0197]** En realizaciones adicionales, los tensioactivos hidrófilos útiles en la presente memoria descriptiva incluyen alternativa o adicionalmente cualquiera de una amplia variedad de tensioactivos catiónicos, aniónicos, de ión híbrido, y anfóteros tal como se conoce en la técnica (Véanse por ejemplo, McCutcheon's, Emulsifiers and Detergents, North American and International Editions, MC Publishing Co. [2003]; Patente de los Estados Unidos N° 5.011.681 Patente de los Estados Unidos N° 4.421.769; y Patente de los Estados Unidos N° 3.755.560).

**[0198]** Una variedad de tensioactivos aniónicos son también útiles en la presente memoria descriptiva (Véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N° 3.929.678). Los tensioactivos aniónicos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a isetonatos de alcohólo (por ejemplo,  $C_{12} - C_{30}$ ) alquil y alquil éter sulfatos y sus sales, alquil y alquil éter fosfatos y sus sales, alquil metil tauratos (por ejemplo,  $C_{12} - C_{30}$ ), y jabones (por ejemplo, alquilamina sustituida y sales de metales alcalinos, por ejemplo, sales de sodio o potasio) o ácidos grasos.

**[0199]** Son también útiles en la presente memoria descriptiva los tensioactivos anfóteros y de ión híbrido. Los ejemplos de tensioactivos anfóteros y de ión híbrido preferidos que encuentran uso en las composiciones de la presente invención son aquellos que están ampliamente descritos como derivados de aminas alifáticas secundarias y terciarias en las que el radical alifático puede ser de cadena lineal o ramificada y en el que uno de los sustituyentes alifáticos contiene entre aproximadamente 8 y aproximadamente 22 átomos de carbono (preferiblemente  $C_8 - C_{18}$ ) y uno contiene un grupo aniónico que se solubiliza en agua (por ejemplo, carboxilo, sulfonato, sulfato, fosfato, o fosfonato). Los ejemplos, incluyen pero no se limitan a derivados de alquil imino acetatos e iminodialcanoatos y aminoalcanoatos, imidazolio y amonio. Otros tensioactivos anfóteros y de ión híbrido adecuados son los seleccionados entre el grupo que consiste en betaínas, sultainas, hidroxisultainas, y alcanoil sarcosinatos ramificados y no ramificados, y sus mezclas.

**[0200]** En realizaciones adicionales, algunas emulsiones de la presente invención incluyen una silicona que contiene un emulsionante o un tensioactivo. Una amplia variedad de siliconas emulsionantes encuentran uso en la presente memoria descriptiva. Estas siliconas emulsionantes son normalmente organopolisiloxanos orgánicamente modificados, conocidos también por los expertos en la materia como siliconas tensioactivas. Las siliconas emulsionantes útiles incluyen, pero no se limitan a copolios de dimeticona. Estos materiales son polidimetil siloxanos que se han modificado para incluir cadenas secundarias de poliéter tales como cadenas de óxido de polietileno, cadenas de óxido de polipropileno, mezclas de estas cadenas y cadenas de poliéteres que contienen restos derivados de óxido de etileno y óxido de propileno. Otros ejemplos incluyen copolios de dimeticona modificados con alquilo (es decir, compuestos que contienen cadenas secundarias de las que penden  $C_2-C_{30}$ ). Otros copolios de dimeticona adicionales útiles incluyen materiales que tiene diversos restos pendientes catiónicos, aniónicos, anfóteros, y de ión híbrido.

**[0201]** En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención comprenden al menos un agente polimérico espesante. Los agentes poliméricos espesantes útiles en la presente memoria descriptiva tienen preferiblemente un peso molecular promedio en número mayor de aproximadamente 20.000, más preferiblemente mayor de aproximadamente 50.000, y lo más preferible mayor de aproximadamente 100.000. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención comprenden entre aproximadamente 0,01% a aproximadamente 10%, preferiblemente entre aproximadamente 0,1% a aproximadamente 8% y más preferiblemente entre aproximadamente 0,2% a aproximadamente 5% en peso de la composición del agente

espesante polimérico o de sus mezclas.

**[0202]** Los agentes espesantes poliméricos preferidos para su uso en la presente memoria descriptiva incluyen, pero no se limitan a agentes espesantes no iónicos y agentes espesantes aniónicos o sus mezclas. Los agentes  
5 espesantes no iónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a polímeros de poliacrilamida, poli(N-vinilpirrolidonas) reticuladas, polisacáridos, gomas naturales o sintéticas, polivinilpirrolidona y polivinilalcohol. Los agentes espesantes aniónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a copolímeros de ácido acrílico/acrilato de etilo, polímeros de carboxivinilo y copolímeros reticulados de alquil vinil éteres y anhídrido maleico. Espesantes comercialmente disponibles (*por ejemplo*, Carbopol; Noveon) encuentran uso en algunas realizaciones de la presente invención. Las  
10 resinas de carbopol adecuadas pueden modificarse hidrofóbicamente, y otras resinas adecuadas se describen en el documento WO98/22085, o sus mezclas.

**[0203]** En algunas realizaciones, las presentes composiciones comprenden al menos una silicona en fase oleosa. La(s) silicona(s) en fase(s) oleosa(s) comprende entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 20%,  
15 preferiblemente entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 10%, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 5%, de la composición. La silicona en fase oleosa comprende preferiblemente uno o más componentes de silicona.

**[0204]** En algunas realizaciones, los componentes de silicona son fluidos, incluyendo siliconas de cadena lineal, ramificada y cíclica. Las siliconas fluidas adecuadas útiles en la presente memoria descriptiva incluyen siliconas  
20 inclusive de fluidos de polialquil siloxano, fluidos de poliaril siloxano, polialquilsiloxanos cíclicos y lineales, siliconas polialcoxiladas, siliconas modificadas por amino y amonio cuaternario, polialquilarilsiloxanos, o un copolímero de polietersiloxano y sus mezclas. Fluidos de silicona volátiles, así como no volátiles, encuentran uso en la presente memoria descriptiva. Las siliconas fluidas tienen generalmente un peso molecular promedio de menos de aproximadamente 200.000. En realizaciones preferidas, las siliconas fluidas adecuadas tienen un peso molecular de  
25 aproximadamente 100.000 o menos, preferiblemente aproximadamente 50.000 o menos, y más preferiblemente aproximadamente 10.000 o menos. Preferiblemente, la silicona fluida se selecciona entre siliconas fluidas que tienen un peso molecular promedio en el intervalo entre aproximadamente 100 y aproximadamente 50.000 y preferiblemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 40.000. Normalmente, las siliconas fluidas tienen una viscosidad que varía entre aproximadamente 0,65 y aproximadamente 600.000 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>, preferiblemente entre  
30 aproximadamente 0,65 y aproximadamente 10.000 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> a 25°C. La viscosidad se puede medir por medio de un viscosímetro capilar de vidrio como se muestra en el Procedimiento de Ensayo CTM0004, de 29 de julio de 1970 de la Dow Corning Corporate. Los polidimetil siloxanos adecuados que se pueden usar en la presente memoria descriptiva incluyen compuestos comercialmente disponibles (*por ejemplo*, de la General Electric Company y Dow Corning). Son también útiles los polialquilarilsiloxanos esencialmente no volátiles, por ejemplo,  
35 polimetilfenilsiloxanos, que tienen viscosidades de aproximadamente 0,65 a 30.000 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> a 25°C (General Electric Company o de Dow Corning). Los polidimetilsiloxanos cíclicos adecuados para el uso en la presente memoria descriptiva son aquellos que tienen una estructura de anillo que incorpora entre aproximadamente 3 a aproximadamente 7 restos (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiO, preferiblemente, aproximadamente 5 o más.

**[0205]** En realizaciones adicionales, las gomas de silicona encuentran uso en la presente memoria descriptiva. En algunas realizaciones preferidas, una silicona en fase oleosa comprende una goma de silicona o una mezcla de siliconas que incluye la goma de silicona. Normalmente, las gomas de silicona tienen una viscosidad a 25°C en exceso de aproximadamente 1.000.000 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>. Las gomas de silicona incluyen dimeticonas tal como se conoce en la técnica (Véanse por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N° 4.152.416; y Noll, Chemistry and Technology of  
45 Silicones, Academic Press, Nueva York [1968]). Las gomas de silicona, tal como las descritas en las General Electric Silicone Rubber Product Data Sheets SE 30, SE 33, SE 54 y SE 76, encuentran también uso en la presente invención. Los ejemplos específicos de gomas de silicona incluyen polidimetilsiloxano, copolímero de (polidimetilsiloxano)(metilvinilsiloxano), copolímero de poli(dimetilsiloxano)(difenil)(metilvinilsiloxano) y sus mezclas. Las gomas de silicona preferidas para su uso en la presente memoria descriptiva son las gomas de silicona que  
50 tienen un peso molecular de entre aproximadamente 200.000 a aproximadamente 4.000.000 seleccionadas entre dimeticonol, dimeticona copoliol, dimeticona y sus mezclas.

**[0206]** En algunas realizaciones, una fase de silicona en la presente memoria descriptiva comprende preferiblemente una goma de silicona incorporada en la composición como parte de la mezcla fluida de goma de silicona. Cuando la goma de silicona se incorpora como parte de la mezcla fluida de goma de silicona, la goma de silicona constituye preferiblemente entre aproximadamente 5% a aproximadamente 40%, especialmente entre aproximadamente 10% a 20% en peso de la mezcla fluida de goma de silicona. Las mezclas fluidas de goma de silicona adecuadas en la presente memoria descriptiva son mezclas que consisten esencialmente en:

- 60 (i) una silicona que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 200.000 y aproximadamente 4.000.000 seleccionadas entre dimeticonol, fluorosilicona y dimeticona y sus mezclas; y  
(ii) un vehículo que es una silicona fluida, teniendo el vehículo una viscosidad entre aproximadamente 0,65 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> y aproximadamente 100 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>,

en la que la relación de i) a ii) es de aproximadamente 10:90 a aproximadamente 20:80 y en la que dicho componente basado en la goma de silicona tiene una viscosidad final de entre aproximadamente  $100 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$  y aproximadamente  $100.000 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ , preferiblemente de  $500 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$  a aproximadamente  $10.000 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ ,

5 **[0207]** Los componentes de silicona adicionales adecuados para el uso en una silicona en fase oleosa en la presente memoria descriptiva incluyen polímeros de poliorganosiloxano reticulados, opcionalmente dispersos en un vehículo fluido. En general, cuando están presentes los polímeros de poliorganosiloxano reticulados, junto con su vehículo (si está presente) comprenden entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 20%, preferiblemente entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 10%, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 5% de la composición. Dichos polímeros comprenden polímeros de poliorganosiloxano reticulados mediante un agente de reticulación (Véase por ejemplo, documento WO98/22085). Los ejemplos de polímeros de poliorganosiloxano adecuados para su uso en la presente memoria descriptiva incluyen, pero no se limitan a metilvinil dimeticona, metilvinil difenil dimeticona y metilvinil fenil metil difenil dimeticona.

10 **[0208]** Otro tipo de componentes de silicona adecuado para el uso en una silicona en fase oleosa incluye copolímeros de polidiorganosiloxano-polioxialquileno que contienen al menos un segmento de polidiorganosiloxano y al menos un segmento de polioxialquileno (Véase por ejemplo, documento WO98/22085). Los copolímeros de polidiorganosiloxano-polialquileno están comercialmente disponibles con los nombres comerciales BELSIL® de Wacker-Chemie GmbH. Una mezcla fluida de copolímero particularmente preferido para su uso en la presente memoria descriptiva incluye Dow Corning DC3225C que tiene la designación de dimeticona copoliol/Dimeticona de la CTFA.

15 **[0209]** En realizaciones adicionales, las composiciones de la presente invención comprenden un bronceador solar orgánico. En algunas realizaciones, los bronceadores solares adecuados tienen propiedades absorbentes UVA, mientras que otros tienen propiedades absorbentes UVB, y otros más comprenden una de sus mezclas. La cantidad exacta del bronceador solar activo varía, dependiendo del Factor de Protección Solar deseado (es decir, el "FPS" de la composición, así como del nivel deseado de protección UV. El FPS se define como una relación de la energía ultravioleta requerida para producir un eritema mínimo en piel protegida a la requerida para producir el mismo eritema mínimo en piel no protegida en el mismo individuo. Las cantidades de los bronceadores solares usados son preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 20%, y más preferiblemente de aproximadamente 4% a aproximadamente 14%. Los bronceadores solares adecuados incluyen, pero no se limitan a los aprobados para el uso en los Estados Unidos, Japón, Europa y Australia. Las composiciones de la presente invención comprenden preferiblemente un FPS de aproximadamente 2 a aproximadamente 30, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 30, y más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 15.

20 **[0210]** En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden ser uno o más bronceadores solares absorbentes de UVA activos que absorben la radiación UV que tiene una longitud de onda de entre aproximadamente 320 nm a aproximadamente 400 nm, Los bronceadores solares absorbentes de UVA activos adecuados incluyen, pero no se limitan a derivados de dibenzoilmetano (Véase por ejemplo, Lowe y Shaath (eds.), Sunscreens: Development, Evaluation, and Regulatory Aspects, Marcel Dekker, Inc.), derivados de antranilato tales como metilantranilato y homometilo, 1-N-acetilantranilato, y sus mezclas. El bronceador solar absorbente de UVA activo está preferiblemente presente en una cantidad suficiente para proporcionar un amplio espectro de protección UVA tanto de manera independiente, como en combinación con, otros protectores UV activos que pueden estar presentes en la composición.

25 **[0211]** Los bronceadores solares absorbentes de UVA activos adecuados incluyen bronceadores solares de dibenzoilmetano activos y sus derivados. Incluyen, pero no se limitan a, los seleccionados entre 2-metildibenzoilmetano, 4-metildibenzoilmetano, 4-isopropildibenzoilmetano, 4-terc-butildibenzoilmetano, 2,4-dimetildibenzoilmetano, 2,5-dimetildibenzoilmetano, 4,4'-diisopropilbenzoilmetano, 4-(1,1-dimetiletel)-4'-metoxidibenzoilmetano, 2-metil-5-isopropil-4'-metoxidibenzoilmetano, 2-metil-5-terc-butil-4'-metoxi-dibenzoilmetano, 2,4-dimetil-4'-metoxidibenzoilmetano, 2,6-dimetil-4'-terc-butil-4'-metoxidibenzoilmetano, y sus mezclas. Los bronceadores solares de dibenzoílo activos preferidos incluyen los seleccionadas entre 4-(1,1-dimetiletel)-4'-metoxidibenzoilmetano, 4-isopropildibenzoilmetano, y sus mezclas. Un bronceador solar activo preferido es 4-(1,1-dimetiletel)-4'-metoxidibenzoilmetano.

30 **[0212]** El bronceador solar activo 4-(1,1-dimetiletel)-4'-metoxidibenzoilmetano, que se conoce también como butil metoxidibenzoilmetano o "avobenzona," está comercialmente disponible con los nombres de Parsol® 1789 de Givaudan Roure (International) S. A., y Eusolex® 9020 de Merck & Co., Inc. El bronceador solar 4-isopropildibenzoilmetano, que se conoce también como isopropildibenzoilmetano, está comercialmente disponible de Merck con el nombre de Eusolex® 8020.

35 **[0213]** En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen además uno o más bronceadores solares UVB activos que absorben radiación UV que tiene una longitud de onda de aproximadamente 290 nm a aproximadamente 320 nm. Las composiciones comprenden una cantidad del bronceador solar UVB activo

que es segura y eficaz para proporcionar protección UVB tanto de manera independiente, como en combinación con, otros protectores UV activos que pueden estar presentes en las composiciones. Las composiciones comprenden entre aproximadamente 0,1% a aproximadamente 20%, preferiblemente entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 12%, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 8% en peso, de cada bronceador solar orgánico absorbente de UVB, o tal como se demanda por la(s) autoridad(es) reguladora(s) relevante(s).

**[0214]** Una variedad de bronceadores solares UVB activos son adecuados para el uso en la presente memoria descriptiva (*Véanse por ejemplo*, Patente de los Estados Unidos N° 5.087.372; Patente de los Estados Unidos N° 5.073.371; Patente de los Estados Unidos N° 5.073.372; Patente de los Estados Unidos N° 4.937.370; y Patente de los Estados Unidos N° 4.999.186). Los bronceadores solares UVB activos preferidos se seleccionan entre 2-etilhexil-2-ciano-3, 2-etilhexil N,N-dimetil-p-aminobenzoato, ácido p-aminobenzoico, oxibenzona, salicilato de homomentilo, salicilato de octilo, 4,4'-metoxi-t-butildibenzoilmetano, 4-isopropil dibenzoilmetano, 3-benzilideno alcanfor, 3-(4-metilbenzolideno) alcanfor, 3-difenilacrilato, ácido 2-fenil-benzimidazol-5-sulfónico (PBSA), ésteres de cinamato y sus derivados tales como 2-etilhexil-p-metoxicinamato, ésteres de salicilato y sus derivados tales como salicilato de trietanolamina, salicilato de etilhexilo, ácido octildimetil para-aminobenzoico, derivados de alcanfor y sus derivados, y sus mezclas. Los bronceadores solares orgánicos activos preferidos incluyen 2-etilhexil-2-ciano-3,3-difenilacrilato, ácido 2-fenil-benzimidazol-5-sulfónico (PBSA), octil-p-metoxicinamato, y sus mezclas. Son también útiles en la presente memoria descriptiva las formas neutralizadas de sales y ácidos de los bronceadores solares ácidos.

**[0215]** En algunas realizaciones, se añade al menos un agente a cualquiera de las composiciones útiles en la presente invención para estabilizar el bronceador solar UVA para evitar la fotodegradación del mismo en la exposición a la radiación UV y mantener por tanto su eficacia de protección a UVA. Se informa que un amplio intervalo de compuestos tienen estas propiedades estabilizantes y deben escogerse para complementar el bronceado solar absorbente de UVA y la composición como un todo (*Véanse por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos N°s 5.972.316; 5.968.485; 5.935.556; 5.827.508; y el documento WO 00/06110). Los ejemplos preferidos de agentes estabilizantes para su uso en la presente invención incluyen 2-etilhexil-2-ciano-3, 3-difenilacrilato, etil-2-ciano-3, 3-difenilacrilato, 2-etilhexilo-3, 3-difenilacrilato, etil-3, 3-bis(4-metoxifenil)acrilato, dietilhexil 2,6 naftalato y sus mezclas (Symrise Chemical Company).

**[0216]** En algunas realizaciones, se añade al menos un agente a cualquiera de las composiciones útiles en la presente invención para mejorar la sustentividad de la piel de aquellas composiciones, particularmente, para aumentar su resistencia a eliminarse mediante lavado por agua o por frotado. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a copolímero de acrilatos/alquilmacrilato C<sub>12-22</sub>, copolímero de acrilato/acrilato, dimeticona, dimeticonol, injerto copolímero de (dimetilsiloxano/metacrilato de i-butilo), lauril dimeticona, copolímero de PVP/Hexadecano, copolímero de PVP/Eicoseno, tricontanil PVP y trimetoxisiloxisilicato.

**[0217]** En adición a los bronceadores solares orgánicos, en algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención comprenden adicionalmente bloqueadores solares físicos (*Véanse por ejemplo*, TFA International Cosmetic Ingredient Dictionary, 6ª Edición, pp. 1026-28 y 1103 [1995]; Sayre y col., J. Soc. Cosmet. Chem., 41: 103-109 [1990]; y Lowe y col., más arriba). Los bloqueadores solares físicos inorgánicos preferidos incluyen el óxido de cinc y el dióxido de titanio y sus mezclas.

**[0218]** Cuando se usan en las realizaciones preferidas, los bloqueadores solares físicos están presentes en una cantidad tal que las presentes composiciones son transparentes sobre la piel (*es decir*, no blanqueantes), preferiblemente entre aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20%, preferiblemente entre aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10%, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5% a 5% en peso. Cuando se usa dióxido de titanio, este puede tener una estructura de anatasa, rutilo o bien amorfa. Los fabricantes de dióxido de titanio y óxido de cinc de calidad micronizada para el uso en bronceadores solares incluyen, pero no se limitan a Tayca Corporation, Uniqema, Shinetsu Chemical Corporation, Kerr-McGee, Nanophase, Nanosource, Sachtleben, Elementis, y BASF Corporation, así como sus agentes de distribución y las compañías que procesan adicionalmente el material para el uso del bronceador solar. Las partículas bloqueadoras solares físicas (*por ejemplo*, dióxido de titanio y óxido de cinc) pueden estar sin revestir o revestidas con una variedad de materiales que incluyen, pero no se limitan a aminoácidos, compuestos de aluminio tales como alúmina, estearato de aluminio, laurato de aluminio, y similares; ácidos carboxílicos y sus sales (*por ejemplo*, ácido esteárico y sus sales); fosfolípidos, tales como lecitina; compuestos orgánicos de silicona; compuestos inorgánicos de silicona tales como sílice y silicatos y sus mezclas. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención comprenden entre aproximadamente 0,1% a aproximadamente 15%, preferiblemente entre aproximadamente 0,1% a aproximadamente 7%, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5%, en peso, de un bronceador solar inorgánico.

**[0219]** En algunas realizaciones preferidas, la composición de la presente invención incluye también conservantes. Dichos conservantes incluyen, pero no se limitan a pentilenglicol, tetraacetato de etilendiamina (EDTA) y sus sales,

clorhexidina (y sus derivados diacetato, diclorhidrato, digluconato), 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol, paracloro metaxilenol, clorhidrato de polihexametilenobiguanida, ácido dehidroacético, diazolidinil urea, alcohol 2,4-diclorobencílico, 4,4-dimetil-1,3-oxazolidina, formaldehído (por ejemplo, disolución acuosa al 37%, con metanol al 10-15% para evitar la polimerización), glutaraldehído, dimetilidantoína, imidazolidinil urea, 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona, orto-fenilfenol, ésteres del ácido 4-hidroxibenzoico (por ejemplo, "parabeno") y sus metil, etil, propil, isopropil, butil, y isobutilésteres, triclosán, 2-fenoxiethanol, acetato fenil mercurico, borato, nitrato, quaternium-15, salicilato, ácido salicílico y sus sales, calcio, sorbato de calcio, ácido sórbico y sus sales, yodopropanil butilcarbamato de zincpiritiona, alcohol bencílico, 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, ácido benzoico y sus sales, sulfitos, bisulfitos, fenoxietanol, cloroxilenol, diazolidinil urea, metilparabenos, propilparabenos, isopropilparabenos, isobutilparabenos, butilparabenos, etilparabeno, fenoxietanol PG, y cloruro de benzalconio.

**[0220]** Una variedad de ingredientes opcionales tales como agentes de neutralización, perfumes y agentes solubilizantes de perfumes, y agentes colorantes, encuentran también uso en alguna de las composiciones en la presente memoria descriptiva. Se prefiere que cualquier ingrediente adicional aumente los beneficios de suavidad/tersura de la piel del producto. Adicionalmente se prefiere que cualquiera de dichos ingredientes no afecte negativamente las propiedades estéticas del producto.

**[0221]** Otros materiales opcionales incluyen agentes queratolíticos, así como conservantes solubles en agua y/o solubilizables, preferiblemente a un nivel de entre aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5% (por ejemplo, germall 115, ésteres de metilo, etilo, propilo y butilo del ácido hidroxibenzoico, alcohol bencílico, DMDM hidantoína yodopropanil butilcarbamato disponible con el nombre comercial de Glydant Plus de Lonza; EDTA, EUXYL® K400, Bromopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) y fenoxipropanol); antibacterianos (por ejemplo, IRGASAB®) y fenoxietanol (preferiblemente a niveles de entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 5%); así como agentes humectantes solubles o coloidalmente solubles tales como ácido hialurónico, sulfato de condroitina, y poliácridatos de sodio injertados con almidón (por ejemplo, SANWET® IM-1000, IM-1500 e IM-2500, disponibles de Celanese Superabsorbent Materials, Portsmouth, VA, Véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N° 4.076.663; vitaminas tales como vitamina A, vitamina C, vitamina E y sus derivados y sus bloqueantes de construcción tales como fitantriol, y vitamina K y sus componentes, tales como el alcohol graso dodecatrienol; hidroxiácidos alfa y beta; aloe vera; esfingosinas y fitoesfingosinas, colesterol; agentes blanqueantes de la piel; N-acetil cisteína; agentes colorantes; agentes antibacterianos tales como TCC/TCS, conocidos también como triclosán y triclorocarbono; perfumes y solubilizantes de perfumes. Los ejemplos de hidroxiácidos alfa incluyen ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, ácido glicólico junto con glicolato de amonio, ácido alfa hidroxietanoico, ácido alfa hidroxioctanoico, ácido alfa hidroxicaprílico, ácido hidroxicaprílico, ácido de fruta mixta, trialfahidroxiácidos de fruta, ácido de fruta triple, extracto de caña de azúcar, alfa hidroxiácidos y productos vegetales, 1-alfahidroxiácidos y glicómero en ácidos grasos reticulados (por ejemplo alfa nutrium). Los ejemplos preferidos de alfa hidroxiácidos son el ácido glicólico y el ácido láctico. Se prefiere que los alfa hidroxiácidos se usen en niveles de hasta aproximadamente 10%. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún compuesto particular derivado de ninguna fuente particular, ya que cualquier compuesto aditivo adecuado, obtenido tanto de fuentes naturales como a través de síntesis en el laboratorio encuentra uso en la presente invención.

**[0222]** Otros materiales opcionales incluyen conservantes solubles en agua o solubilizables, preferiblemente a un nivel de entre aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5% cada uno, tal como Germall 115, ésteres de metilo, etilo, propilo y butilo del ácido hidroxibenzoico, alcohol bencílico, DMDM hidantoína yodopropanil butilcarbamato disponible con el nombre comercial Glydant Plus de Lonza, EDTA, Euxyl (RTM) K400, Bromopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), pentilenglicol y fenoxipropanol; antibacterianos tales como Irgasan (RTM) y fenoxietanol (preferiblemente a niveles de entre 0,1% a aproximadamente 5%). Los agentes antibacterianos tales como TCC/TCS, conocidos también como triclosán y triclorocarbono son también útiles en las composiciones de la presente invención.

**[0223]** Los agentes de neutralización adecuados para el uso en un grupo ácido de neutralización que contiene agentes gelificantes hidrófilos en la presente memoria descriptiva incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, monoetanolamina, dietanolamina, aminometilpropanol, tampón tris y trietanolamina.

**[0224]** Otros materiales opcionales que encuentran uso en la presente invención incluyen cualquiera de numerosos ingredientes funcionales y/o activos conocidos por los expertos en la técnica (Véase por ejemplo, McCutcheon's Functional Materials, North American and International Editions, MC Publishing Co. [2003]). Tal como se ha indicado anteriormente, los ejemplos no limitantes incluyen agentes queratolíticos, agentes humectantes solubles o coloidalmente solubles tales como ácido hialurónico y sulfato de condroitina; vitaminas tales como vitamina A, vitamina C, vitamina E, vitamina K y sus derivados y sus bloques de construcción; fitantriol; alcoholes grasos tales como dodecatrienol; alfa y beta hidroxiácidos; aloe vera, esfingosinas y fitoesfingosinas, colesterol; agentes blanqueantes de la piel; N-acetilcisteína; agentes colorantes; los ejemplos de alfa hidroxiácidos incluyen ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico y ácido cítrico (tanto derivado sintéticamente como de fuentes naturales y

usado tanto solo como en combinación) y sus ésteres de combinaciones tamponantes relevantes. Otros ejemplos de alfa hidroxiácidos incluyen ácido alfa hidroxietanoico, ácido alfa hidroxiocetanoico, ácido alfa hidroxicaprílico, y ácido hidroxicaprílico. Los ejemplos preferidos de alfa hidroxiácidos incluyen ácido glicólico y ácido láctico. Se prefiere que los alfa hidroxiácidos se usen en niveles de hasta aproximadamente un 10%.

5

**[0225]** Los materiales opcionales incluyen pigmentos que, cuando son insolubles en agua, contribuyen a y están incluidos en el nivel total de ingredientes en fase oleosa. Los pigmentos adecuados para el uso en las composiciones de la presente invención pueden ser orgánicos y/o inorgánicos. Incluidos también en el término "pigmento" están los materiales un color o lustre bajo, tal como los agentes de acabado en mate, los agentes de dispersión de la luz, y los adyuvantes de la formulación tales como micas, seracitas, y las sales de carbonatos. Los ejemplos adicionales de pigmentos adecuados incluyen dióxido de titanio, óxidos de hierro, óxidos de glutamato hierro, óxido de cinc, oxiclورو de bismuto, azul ultramarino (todos los cuales pueden tanto predispersarse y/o prerrevestirse o no), los colorantes y las lacas D&C, los colores FD&C, los aditivos de colores naturales tales como el carmín, y sus mezclas. Dependiendo del tipo de composición, se usa normalmente una mezcla de pigmentos en las realizaciones preferidas de la presente invención. Los pigmentos preferidos para el uso en la presente memoria descriptiva desde el punto de vista de la humectación, la sensación en piel, la apariencia de la piel y la compatibilidad de la emulsión son los pigmentos tratados. En algunas realizaciones, los pigmentos se tratan con compuestos, que incluyen, pero que no se limitan a aminoácidos, siliconas, lecitina y ésteres de aceites.

10

15

**[0226]** En realizaciones preferidas, el pH de las composiciones en la presente memoria descriptiva está en el intervalo de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, y más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, en la que el pH de la composición final se ajusta mediante la adición de sales ácidas, básicas o de tampón según sea necesario, dependiendo de la composición de las formas y de los requerimientos del pH de los compuestos.

20

**[0227]** Las composiciones de la presente invención se preparan mediante las técnicas normalizadas bien conocidas de los expertos en la técnica. En general la fase acuosa y/o la fase oleosa se preparan por separado, repartiéndose con materiales de fase similar que se añaden en cualquier orden. Si el producto final es una emulsión, las dos fases se combinan a continuación con agitación y/u homogeneización vigorosas según sea necesario, para reducir el tamaño de las gotículas de la fase interna. Cualquier ingrediente en la formulación con elevada volatilidad, o que sea susceptible de hidrólisis o descomposición a elevadas temperaturas, se añade con agitación suave hacia el final del proceso, después que sea aplicable la emulsificación. La frecuencia y la cantidad de dosificación dependerán de los criterios de rendimiento deseados.

30

### 35 **Parte experimental**

**[0228]** Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar algunas realizaciones y aspectos preferidos de la presente invención y no se construyen como limitantes de su alcance.

**[0229]** En la divulgación experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: PI (inhibidor de la proteinasa), BBI (inhibidor de Bowman-Birk), STI (inhibidor de la tripsina de soja); ppm (partes por millón); VEGF y VegF (Factor de crecimiento endotelial vascular); M (molar); mM (milimolar);  $\mu$ M (micromolar); nM (nanomolar); mol (moles); mmol (milimoles);  $\mu$ mol (micromoles); nmol (nanomoles), g (gramos); mg (miligramos);  $\mu$ g (microgramos); pg (picogramos); l (litros); ml y mL (mililitros);  $\mu$ l y  $\mu$ L (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros);  $\mu$ m (micrómetros); nm (nanómetros); U (unidades); v (voltios); MW (peso molecular); s (segundos); min(s) (minuto/minutos); h (hora/horas), °C (grados Centígrados); QS (cantidad suficiente); ND (no realizado); NA (no aplicable); rpm (revoluciones por minuto); H<sub>2</sub>O (agua); dH<sub>2</sub>O (agua desionizada); HCl (ácido clorhídrico); aa (aminoácido); pb (pares de bases); kb (pares de kilobases); kD (kiloDaltons); ADNc (copia de ADN o complementario); ADN (ácido desoxirribonucleico); ADNss (ADN monocatenario); ADNds (ADN dicatenario); dNTP (desoxirribonucleótido trifosfato); ARN (ácido ribonucleico); MgCl<sub>2</sub> (cloruro de magnesio); NaCl (cloruro de sodio); w/v (peso a volumen); v/v (volumen a volumen); g (gravedad); DO (densidad óptica); A<sub>405</sub> (absorbancia a 405 nm); V<sub>max</sub> (la velocidad inicial máxima de una reacción catalizada por una enzima); FGFR1(IIIc) (receptor FGF-5); Disolución tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS); SOC (Bacto tripton a 2%, Extracto de levadura Bacto al 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM); Caldo Terrífico (TB; 12 g/l de Bacto tripton, 24 g/l de glicerol, 2,31 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12,54 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); DO<sub>280</sub> (densidad óptica a 280 nm); DO<sub>600</sub> (densidad óptica a 600 nm); PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida); PBS (solución salina tamponada con fosfato [NaCl 150 mM, tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2]); PBST (PBS+ Tween® 20 al 0,25%); PEG (polietilenglicol); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); RT-PCR (PCR mediante transcripción inversa); SDS (dodecil sulfato de sodio); bME, BME y  $\beta$ ME (beta-mercaptoetanol o 2-mercaptoetanol); Tris-HCl C<sub>1</sub> (Clorhidrato de tris[hidroximetil]aminometano); Tricina (N-[tris-(hidroximetil)-metil]-glicina; CHES ácido (2-(N-ciclo-hexilamino) etanosulfónico); TAPS ácido (3-[tris-(hidroximetil)-metil]-amino-propanosulfónico); CAPS ácido (3-(ciclo-hexilamino)-propanosulfónico); DMSO (dimetilsulfóxido); DTT (1,4-ditio-DL-treitol); Glut y GSH (glutación reducido); GSSG (glutación oxidado); TCEP (Tris[2-carboxietil] fosfina); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); HEPES ácido (N-[2-Hidroxietil]piperazina-N-[2-etanosulfónico]); HBS (solución

50

60

salina tamponada con HEPES); SDS (dodecilsulfato de sodio); Tris-HCl (Clorhidrato de tris[Hydroximetil]aminometano); Ci (Curios) mCi (miliCurios); PCi (microCurios); TLC (cromatografía en capa fina); Ts (tosilo); Bn (bencilo); Ph (fenilo); Ms (mesilo); Et (etilo), Me (metilo); Klenow (fragmento grande de ADN polimerasa I (Klenow) ); rpm (revoluciones por minutos); EGTA ácido (etilen glicol-bis(b-aminoetil éter) N, N, N', N'-tetraacético);

5 EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); bla (b-lactamasa o gen de resistencia a la ampicilina); PDS (suero bovino derivado de plasma que se ha dializado para eliminar factores de crecimiento, la diálisis del plasma bovino desfibrinado se lleva a cabo frente a DMDM durante aproximadamente 6 horas a 4°C, con agitación, se cambian los medios y la diálisis continúa durante la noche; el PDS dializado se recoge después de 24 horas, y se filtra en estéril dos veces a través de un filtro de 0,2 µm); FCS y FBS (suero de ternera fetal); GE Healthcare (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido); DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, CA); OXOID (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido); Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co., Wicklow, Irlanda); Corning (Corning Life Sciences, Corning, NY); (NEN (NEN Life Science Products, Boston, MA); Pharma AS (Pharma AS, Oslo, Noruega); Dynal (Dynal, Oslo, Noruega); Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewisville, TX); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, NY); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA); Clontech (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA); Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI); Oxoid (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); Millipore (Millipore, Billerica, MA); Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA); NEB (New England Biolabs, Beverly, MA); Cambrex (Cambrex Bioproducts, East Rutherford, NJ); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL); Takara (Takara Bio Inc. Otsu, Japón); Roche (Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza); EM Science (EM Science, Gibbstown, NJ); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA); Biodesign (Biodesign Intl., Saco, Maine); Biosource (Biosource, Intl., Camarillo, CA); Aptagen (Aptagen, Inc., Herndon, VA); Molecular Devices (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA); R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); Marsh (Marsh Biosciences, Rochester, NY); Bio-Tek (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT); Biacore (Biacore, Inc., Piscataway, NJ); PeproTech (PeproTech, Rocky Hill, NJ); SynPep (SynPep, Dublin, CA); Chemicon (CHEMICON, Temecula, CA); Clinical Research Laboratories, (Clinical Research Laboratories, Inc., Piscataway, NJ); and Microsoft (Microsoft, Inc., Redmond, WA).

30 **EJEMPLO 1**

**Composiciones dermatológicas**

35 **[0230]** En este ejemplo, se proporcionan de la siguiente forma diversas composiciones dermatológicas que comprenden cualquiera de los compuestos de la presente invención.

<b>GEL LÍQUIDO HIDRATANTE (pH 7)</b>	
<b>MATERIA PRIMA (Designación INCI)</b>	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada	QS
Glicerina	4,0
Glicéridos PEG-6 Caprílicos/Cápricos	4,0
Ácidos grasos de almendra de palma	3,0
Laureth-3 sulfato de sodio	45,0
Cocoamida MEA	3,0
Lauroanfoacetato de sodio	25,0
Aceite de soja	10,0
Polyquaternium-10	0,70
Conservante, fragancia, color	QS
Compuesto	1000 ppm

<b>GEL LÍQUIDO</b>			
<b>MATERIA PRIMA (Designación INCI)</b>	pH 8	pH 6,5	pH 7
	<b>Cantidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada	QS	QS	QS
Laureth sulfato de sodio	12	15	8
Cocoamidopropil betaína	8	10	15
Decil glucósido	0	2	1
Polyquaternium-10	0,25	0	0
Polyquaternium-7	0	0	0,7
Conservante, fragancia, color	QS	QS	QS
Compuesto	250 ppm	500 ppm	1000 ppm

ES 2 375 360 T3

<b>LOCIÓN CORPORAL</b>	pH 7	pH 7	pH 7,5	pH 7
<b>MATERIA PRIMA</b> (Designación INCI)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Cantidad
Agua desionizada	QS	QS	QS	QS
Glicerina	8	8	0	12
Isohexadecano	3	3	3	6
Niacinamida	0	3	5	6
Isoestearato de isopropilo	3	3	3	3
Poliacrilamida (e) Isoparafina (y) Laureth-7	3	3	3	3
Vaselina	4	4	4	2
Nylon 12	2	2	2,5	2,5
Dimeticona	2	2	2,5	2,5
Sacarosa de semillas de polialgodón oleosas	1,5	1,5	1,5	1,5
Alcohol estearílico al 97%	1	1	1	1
D Pantenol	1	1	1	1
Acetato de DL-alfa tocoferol	1	1	1	1
Alcohol cetílico al 95%	0,5	0,5	0,5	1
Alcohol behenílico	1	1	1	0,5
Alcohol de cetearilo (y) cetearil glucósido	0,4	0,4	0,5	0,5
Ácido esteárico	0,15	0,15	0,15	0,15
Estearato de PEG 100	0,15	0,15	0,15	0,15
Conservante, fragancia, color	QS	QS	QS	QS
Compuestos	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm

<b>EMULSIÓN ULTRA HIDRATANTE</b>	<b>pH 7</b>	<b>pH 7</b>
<b>MATERIA PRIMA</b> (Designación INCI)	<b>Cantidad</b>	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada	QS	QS
Glicerina	12	5
PEG 400	0	10
Niacinamida	5	7
Isohexadecano	5	5
Dimeticona	3	2
Poliacrilamida (e) Isoparafina (y) Laureth-7	3	3
Isoestearato de isopropilo	2	2
Polimetilsilsesquioxano	2	2
Alcohol cetílico al 95%	1	1
Sacarosa de semillas de polialgodón oleosas	1	1
D-Pantenol	1	1
Acetato de tocoferol	1	1
Alcohol estearílico al 95%	0,5	0,5
Cetearil glucósido	0,5	0,5
Dióxido de titanio	0,3	0,3
Ácido esteárico	0,15	0,15
Estearato de PEG-100	0,15	0,15
Conservante, fragancia, color	QS	QS
Compuesto	250 ppm	100 ppm

<b>CREMA HIDRATANTE</b>	<b>pH 7</b>	<b>pH 7</b>	<b>pH 7,5</b>
<b>MATERIA PRIMA</b> (Designación INCI)	<b>Cantidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada	QS	QS	QS
Glicerina	3	5	10
Vaselina	3	3	0
Alcohol cetílico al 95%	1,5	1,5	1
Dimeticona Copoliol	2	2	2
Palmitato de isopropilo	1	1	0,5
Carbopol 954 (Noveon)	0,7	0,7	0,7
Dimeticona (350cs)	1	1	1
Alcohol estearílico al 97%	0,5	0,5	1
Ácido esteárico	0,1	0,1	0,1
Estearato de Peg-100	0,1	0,1	0,1
Dióxido de titanio	0,3	0,3	0,3
Conservante, color, fragancia	QS	QS	QS
Compuesto	50 ppm	250 ppm	1000 ppm

<b>ACONDICIONADOR DE DEPOSICIÓN SOBRE EL CABELLO</b>	
<b>MATERIA PRIMA</b> (Designación INCI)	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada	QS
Isoestearamidopropil Morfolina Lactato	6,0
Hidroxietilcelulosa	1,0
Conservante, fragancia, color	QS
Compuesto	1000 ppm

<b>CREMA DE ACLARADO (pH 4)</b>	
<b>MATERIA PRIMA</b> (Designación INCI)	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada	QS
Cloruro de behenitrmonio	2,0
Trilaureth-4 Fosfato	1,5
Alcohol cetílico	2,0
Ácido cítrico	QS
Conservante, fragancia, color	QS
Compuesto	1000 ppm

<b>TRATAMIENTO NUTRITIVO ACONDICIONADOR DEL CABELLO (pH 6)</b>	
<b>MATERIA PRIMA</b> (Designación INCI)	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada	QS
Metosulfato de behenitrmonio (y) alcohol cetílico	4,0
Aceite de germen de trigo	1,0
Alcohol cetílico	0,5
Propilenglicol	5,0
Lanolina PEG-60	1,0
Pantenol	2,0
Aminoácidos de altramuz	1,0
Proteína de trigo hidrolizada con Hidroxipropil Cocodimonio	1,0
Fragancia, conservante, color	QS
Compuesto	1000 ppm

<b>CHAMPÚ ACONDICIONADOR</b>	
<b>MATERIA PRIMA</b> (Designación INCI)	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada	QS
Laureth sulfato de sodio al 30%	27,0
Cocoamidopropil betaína	3,7
Cocoglucósido (y) Oleato de glicerilo	5,0
Cocoglucósido (y) Diestearato de glicerol (y) Glicerina	3,0
Cloruro de Guar hidroxipropil trimonio	0,1
Laureth-2	1,55
Fragancia, conservante, color	QS
Compuesto	1000 ppm

<b>CHAMPÚ ANTICASPA</b>	
<b>MATERIA PRIMA</b> (Designación INCI)	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada	QS
Silicato de aluminio magnesio	1,0
Hidroxipropilmetilcelulosa	0,8
Sulfato de olefina sodio al 40%	35,0
Lauramida DEA	4,0
Sojamida DEA	1,0
Colágeno hidrolizado con Quaternium-70	2,0
Zincpiritiona al 40%	4,0
Fragancia, conservante, color	QS
Compuesto	1000 ppm

5

**EJEMPLO 2****Ciclos de selección por afinidad en una biblioteca de péptidos expresados en fagos**

- 10 [0231] En este Ejemplo se describen experimentos realizados para realizar ciclos de selección por afinidad en una biblioteca de expresión en fagos. Una biblioteca de expresión en fagos comercial PhD C7C (NEB) se sometió

a ciclos de selección por afinidad frente a hVEGF (R&D systems) durante 3 rondas según las instrucciones del fabricante. Este procedimiento dio como resultado los perfiles de secuencia resumidos en la Figura 1. Se confirmaron los clones individuales mediante ELISA para fagos según las instrucciones del fabricante (Consultar la Figura 2).

5

### EJEMPLO 3

#### Análisis de unión a BIAcore™ de péptidos dirigidos contra VEGF

10 **[0232]** En este Ejemplo se describen experimentos realizados para evaluar las afinidades de los péptidos por VEGF. Las afinidades de los péptidos por VEGF se midieron mediante un sistema de resonancia de plasmón BIAcore™-3000 (Biacore). Un chip sensor CM5 se condicionó con NaOH 50 mM, HCl al 0,1%, SDS al 0,1%, y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,08% y se activó para acoplamiento covalente de FGF-5 mediante clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor

15 (Biacore). El EGF<sub>165</sub> humano (Biosource) se diluyó hasta 5 µg/ml en acetato de sodio 20 mM, pH 4,8 y se inyectó a un caudal de 2 µl/min para conseguir aproximadamente de 1000 a 6000 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. TNFα (TNFα Biosource, Int., Camarillo, CA) se acopló de manera similar al chip sensor CM5 a aproximadamente 850 a 3500 UR en la banda de referencia. Se inyectó una disolución de etanolamina 1 M como agente bloqueante. En algunos experimentos, se inyectaron soluciones adicionales de EDC y NHS para mejorar la

20 estabilidad de la línea inicial, y una disolución de etanolamina 1 M como agente bloqueante. La banda de referencia se activa con EDC y NHS y se bloqueó con etanolamina.

**[0233]** Los péptidos se sintetizaron mediante química Fmoc convencional, se purificaron mediante HPLC de fase invertida hasta una pureza >95% (SynPep), y se guardaron a 10 mg/ml en DMSO. Para las medidas cinéticas,

25 Los péptidos diluidos dos veces en serie en tampón HBS-EP, HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,1 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 (Biacore) al 0,005%, se inyectaron a 25°C a un caudal de 20 µl/min. También se inyectaron muestras diluidas dos veces en serie en DMSO y muestras de tampón para resta de fondo. Los parámetros cinéticos se calcularon mediante el programa informático BIAevaluation 3.1.

### 30 EJEMPLO 4

#### Construcción de las estructuras péptido-BLA

**[0234]** En este Ejemplo se describen los procedimientos usados en la construcción de las construcciones dirigidas contra VEGF-BBI. El plásmido pCM01 (5,1kb) codifica una secuencia CK37281 de 15 aminoácidos fusionada al extremo N de la β-lactamasa (BLA) de *Enterobacter cloacae* con una secuencia señal pIII y una etiqueta 6XHis en el extremo C (Consultar la Figura 4). El plásmido contiene también un gen de Resistencia al cloranfenicol (CAT) como marcador de selección, y la expresión se impulsó mediante un promotor lac (Plac). El plásmido pCM01 se construyó usando un vector Bbs1, el pME30 se construyó a partir de pCB04. pCB04 se digirió con DraIII y SpeI (NEB), dando como resultado fragmentos de 2,8 kb y 2,1 kb. Para realizar estas inserciones, las

40 parejas de oligonucleótidos NtermStf2-F y NtermStf2R (5 µM) se combinaron en un volumen total de 50 µl de agua, la mezcla se calentó hasta 95° C en un bloque calefactor durante 5 minutos, y el bloque se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.

45 **[0235]** **Oligos:** NtermStf2-F y NtermStf2-R para inserción en un vector de relleno:

NtermStf2-F  
5'[Fos]

CTAGTGTCTTCGATCAAGTCGACAACAGCCTGTCTGCAGATCCTGAAGACTGGCGGAG  
GTGGTCGCGAATACGATTACCCCGCTGATGAAAGCACAGA 3' (SEQ ID NO:26)

50

**NtermStf2-R** 5'[Fos]

GTGCTTTCATCAGCGGGGTAATCGTATTGCGGACCACCTCOGCCAGTCTTCAGGATCTG  
CAGACAGGCTGTTGTCGACTTGATCGAAGACA 3' (SEQ ID NO:27)

55

**[0236]** El fragmento de 2,8 kb, el fragmento de 2,1 kb y la inserción de relleno (100 pb) se ligaron durante toda la noche a 16°C en una relación molar 1:1:5 respectivamente usando 10 µl de la mezcla de ADN y 10 µl de

disolución de ligasa Takara I. Las ligaduras se purificaron mediante el kit de limpieza de ADN Zymo Research y se eluyeron en 2 x 8 µl de agua. A continuación, 5 µl de la mezcla de ligadura se transformaron en 50 µl de células electrocompetentes Top 10 (Invitrogen), se añadieron 250 µl de SOC y las células se hicieron crecer durante 1 h a 37°C. La mezcla de transformación se diluyó a 1/10 y se plaqueó en placas LA + 5 ppm CMP y LA + 5 ppm CMP + 0,1 ppm CTX, seguido por incubación durante la noche a 37 °C. Se repicaron 12 colonias a partir de las placas CMP, se hicieron crecer en LB + 5 ppm CMP, se aisló el ADN y se digirió con la enzima BbsI (2 sitios en el plásmido de relleno). pCB04 (WT) también se digirió como control. Un clon tuvo la secuencia correcta, y fue designado como pME22.

10 **[0237]** El plásmido de expresión pCM01 péptido VEGF-BLA se construyó a partir de pME22 usando los siguientes cebadores para la inserción BBs1 (*Consultar la Figura 5*); Oligos VegF-F, VegF-5R, VegF-3RP para la inserción del péptido

#### VegF-F

15

**[0238]**

5'ACTAGTCGTTCTTTCTATTCTCACTCTGCTTGTACCTGTGGCCGACCTTCTGGTGC  
GGTGGAGGTTTCGACGCCAGTGTGAGAAAAACAGCTG 3' (SEQ ID NO:28)

20 **VegF5R**

**[0239]** 5' AGCAGAGTGAGAATAGAAAGGAACGAC 3' (SEQ ID NO:29)

#### VegF-3RP

25

**[0240]** 5' [Phos]CCGCCAGCTGTTGTTCTGACACTGG 3' (SEQ ID NO:30)

**[0241]** Las proteínas de fusión BLA-péptido pCM01 y pCB04 (WT) y una biblioteca desviada pCM04 se expresaron en *E. coli* (TOP10; Invitrogen) se expresaron en matraces agitadores de 1 l en presencia de 5 ppm de CMP y 0,1 ppm del antibiótico cefotaxima a 25°C durante 40 h. se cosecharon pastas celulares de los cultivos celulares de 200 ml y se centrifugaron a 3000 x g durante 10 min. A continuación, las pastas se trataron con 25 ml de reactivo B-PER (Pierce) durante 40 min con mezcla suave. El extracto se separó por centrifugación a 20.000 x g durante 20 min. La actividad BLA de todas las fracciones líquidas se ensayaron con nitrocefina y se calculó la concentración de las proteínas de fusión en cada fracción suponiendo la misma actividad específica que la enzima natural. Las proteínas de fusión se purificaron mediante cromatografía IMAC. Las fracciones activas para BLA eluidas con imidazol se combinaron, y se encontró que la pureza era superior al 95% según se comprobó mediante SDS-PAGE (*Consultar la Figura 6*).

#### **EJEMPLO 5 Cribado de una biblioteca de estructura Péptido-BLA**

40

**[0242]** En este Ejemplo se describen experimentos realizados para cribar una biblioteca de estructuras péptido-BLA. Se revistieron placas COSTAR (96 pocillos) con 0,5 µg (100 µl de 5 µg/ml) de hVEGF<sub>165</sub> (Preprotech) con agitación suave a 4 °C durante toda la noche seguido por bloqueo con tampón bloqueante Superblock (Pierce) durante varias horas a temperatura ambiente. Las muestras His-tag purificadas de pCM01 y pCM04 se diluyeron en serie en tampón de ensayo BLA y se transfirieron porciones de 100 µl a los pocillos revestidos con VEGF. Tras una hora, las placas se lavaron seis veces con PBS, TWEEN®-20 al 0,05% y se añadieron 200 µl de tampón de ensayo nitrocefina que contenía 0,1 mg/ml de nitrocefina (Oxoid) para medir la actividad residual de la beta-lactamasa unida a una Abs<sub>490</sub> /min. Los pocillos de control contenían beta-lactamasa pCB04 como control (*Consultar la Figura 7*).

50 **EJEMPLO 6**

#### **Inhibición de la proliferación de células HUVE mediante péptidos aVEGF.**

**[0243]** En este Ejemplo se describen experimentos realizados para determinar los efectos de los péptidos aVEGF sobre células HUVE. Las células HUVE (celas de la vena umbilical humana; Cambrex) se pasaron 1-5 veces y se mantuvieron según las instrucciones del fabricante. El crecimiento de las células. HUVE se estimuló mediante 0,03 a 20 ng/ml VEGF observando la mayor proliferación a 10 ng/ml VEGF. Esta concentración también se usó en los posteriores experimentos. Se mezcló una serie de péptidos VEGF desde 0,5 nM a 25 µM (y un anticuerpo monoclonal dirigido contra VEGF de control (R&D Systems)) con 10 ng/ml de VEGF antes de la adición a células

HUVE sembradas por triplicado en placas de 96 pocillos. Se midió la proliferación mediante incorporación de <sup>3</sup>H-timidina (*Consultar la Figura 8*). Se observó una inhibición significativa descendiendo hasta 0,4 μM de anti-VEGF.

#### EJEMPLO 7

5

#### Inhibición de la formación de tubos de vasos sanguíneos mediante los conjugados VEGF Péptido

[0244] En este Ejemplo se describen experimentos realizados para evaluar la formación del tubo de vasos sanguíneos. Este ensayo de angiogénesis *in vitro* se obtuvo en forma de Chemicon y se usó según las instrucciones del fabricante.

[0245] Este ensayo proporciona un modelo sencillo de la angiogénesis en el que se puede realizar un seguimiento de la inducción o inhibición de la formación del tubo mediante señales exógenas. Una suspensión de células endoteliales de células HUVE con pocos pasos se mezcló con concentraciones diferentes del inhibidor en presencia de 10 ng/ml de VEGF, antes de añadir las células a la "ECMatrix" (es decir, una disolución que polimeriza *in situ* y proporciona un gel sólido de proteínas base preparado de forma que las células endoteliales se alinean y forman estructuras similares a tubos huecos) La formación de tubos en un proceso multietapa que implica la adhesión, migración, diferenciación y crecimiento celular. La formación tubular resultante se midió con un microscopio de luz invertida a un aumento de 20X-100X. Se observó una inhibición significativa de la formación de túbulos a concentraciones de péptido superiores a 1 μM.

#### EJEMPLO 8

#### Construcción de bibliotecas de expresión en fago de VEGF-Péptido parcial

25

[0246] En este Ejemplo se describen experimentos realizados para construir bibliotecas de expresión en fago. Las bibliotecas de maduración por afinidad utilizadas en los ciclos de selección por afinidad de VEGF se construyeron mediante el sistema de presentación en el gen III del fago C7C que es bien conocido en la técnica (consultar Noren y Noren [2001]). Los oligonucleótidos se sintetizaron y se fosforilaron como es conocido en la técnica. Los oligonucleótidos usados para construir las bibliotecas emplean codones NNK (en la que N = G, A, T, C y K= G o T). El esquema de clonación NNK elimina dos potenciales codones de detención y sigue codificando el resto de los veinte aminoácidos. La biblioteca de péptidos aleatorios expresó 9 aminoácidos aleatorios con dos cisteínas fijas en las posiciones 2 y 9 (XCX7CGGGS; SEQ ID NO:31; X representa cualquier aminoácido) Se crearon siete bibliotecas de péptido CK37282 parcial usando el mismo procedimiento que para la biblioteca aleatoria.

35

#### EJEMPLO 9

#### Construcción de un inhibidor aVEGF Bowman Birk (BBI VEGF 33)

[0247] En este Ejemplo se describe la construcción de una construcción dirigida contra VEGF BBI. Un gen sintético que clonaba el inhibidor de Birk (*Consultar la Figura 9*) con los sitios de restricción adecuados para introducir pequeñas secuencias de codificación de péptidos en el bucle de la tripsina (*SacI-EcoRI* y/o bucle de la quimi tripsina (*EcoRI-Sall*) se clonó en el pET-22b (Novagen) usando los sitios de clonación NdeI/Xho1 según los procedimientos convencionales conocidos en la técnica. El vector resultante, pET BBI, se utiliza como plantilla para insertar las secuencias CK37281, CK37282 en los bucles BBI en forma de casetes de oligonucleótido bicatenario (Operon). Las construcciones se transformaron en *E coli* BL-21 (DE3) y se plaquearon en medio que contenía 50 μg/ml de ampicilina. El ADN plásmido procedente de los clones individuales se aisló mediante procedimientos conocidos en la técnica (Qiagen) y las inserciones correctas se confirmaron por secuenciación del ADN. Los péptidos de interés adicionales incluyen PS-AV1 (1KSAIC-KYYLYWW-CF1V; comprendiendo SEQ ID NO: 16) (péptido comparativo) y PS-AV2 (1KSAIC-TLWKS YW-CF1V; comprendiendo SEQ ID NO:17).

[0248] Las proteínas de fusión y el BBI natural se expresaron en fermentadores de 14 l. se cosecharon las pastas celulares y se aislaron las proteínas de los cuerpos de inclusión mediante una modificación del procedimiento de cribado de FoldIt (Hampton) (*Consultar la Figura 10*).

55

#### EJEMPLO 10

#### Análisis de unión mediante BIAcore™ de BBI-VEGF

[0249] En este Ejemplo se describen los experimentos realizados para determinar la unión por afinidad de las construcciones producidas como se ha indicado en el Ejemplo 9. Se midieron las afinidades de las construcciones BBI-VEGF por VEGF usando resonancia de superficie de plasmón BIAcore-3000 (Biacore). Un chip

60

sensor CM5 se condición con NaOH 50 mM y se active para acoplamiento covalente de VEGF usando clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor (Biacore). El VEGF (VEGF<sub>165</sub> humano, Biosource) se diluyó hasta 5 µg/ml en acetato de sodio 20 mM, pH 4,8, y se inyectó a un caudal de 2 µl/min para conseguir aproximadamente de 1000 a 6000 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. De forma similar se acoplaron la tripsina y la quimiotripsina al chip sensor CM5 a aproximadamente de 850 a 3500 UR en las bandas restantes. Se inyectó una disolución de etanolamina 1 M como agente bloqueante. Se muestra en la Figura 11 la unión por afinidad selectiva a VEGF del BBI-VEGF replegado.

#### EJEMPLO 11

10

#### Ensayo de proliferación celular *in vitro* para probar la actividad de los péptidos inhibidores de hVEGF

**[0250]** En este Ejemplo se describen los experimentos realizados para determinar la actividad antiproliferativa de los péptidos dirigidos contra VEG. La actividad antiproliferativa de los péptidos inhibidores de VEGF se determinó usando células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de la siguiente forma. Células HUVEC de pocos pasos (menos de seis) se sembraron en placas de 96 pocillos a 5000 células por pocillo, y se cosecharon durante 18 h en 200 µl de medio EBM (Cambrex) sin factores de crecimiento y suplementada con FBS al 0,5%, a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%. El medio se sustituyó con 180 µl de medio de crecimiento que contenía medio EBM con suero de feto bovino al 5% y DMSO al 1%. A continuación se añadieron 20 µl de VEGF preincubado durante una hora con concentraciones variables de péptido (la concentración final en DMSO para todos los pocillos fue del 1%) a los pocillos, hasta una concentración final de VEGF de 10 ng/ml. Se usaron anticuerpo VEGF humanos (R & D Systems) como control positivo. Las células con concentraciones de 0,31 a 20 ng/ml de VEGF solo en el medio de crecimiento se usaron para construir una curva de crecimiento patrón. Las células se incubaron durante 48 h más, y se midió la proliferación celular con un ensayo MTS (Kit para ensayo de proliferación celular CellTiter 96 Aqueous One Solution; Promega). A continuación, se añadieron 40 µl de la disolución de MTS tetrazolio a cada pocillo, y tras una incubación de 3 y 4 horas, las placas se leyeron a 490 nM. La absorción del medio solo se restó de todos los puntos de datos. Los resultados indicaron que los péptidos inhibidores de VEGF CK37281 y CK37283 tenían una CI<sub>50</sub> en el intervalo micromolar.

#### 30 EJEMPLO 12

#### Prueba de ataque con parche repetida (RIPT) de un péptido dirigido contra el péptido VEGF sobre la piel humana

**[0251]** En este Ejemplo se describen los experimentos realizados para determinar el resultado de la prueba del parche para péptidos dirigidos contra VEGF. Se formularon muestras del péptido aVEGF CK37281 dosificadas a 0,5% (p/v) en una formulación base que contenía agua desionizada/butilenglicol. Se aplicaron aproximadamente 0,2 ml de la formulación a 200 voluntarios humanos en una prueba de ataque con parche repetida según el procedimiento diseñado por Clinical Research Laboratories, Inc. (Piscataway, NJ). Los resultados indicaron que no se producía irritación o sensibilidad dérmica sobre la piel de dichos voluntarios.

**[0252]** Habiendo descrito las realizaciones preferidas de la presente invención, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden hacer varias modificaciones a las realizaciones dadas a conocer, y dichas modificaciones quedan incluidas en el ámbito de la presente invención tal como se ha definido en las reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en YNLYGWT (SEQ ID NO: 1), TLWPTFW (SEQ ID NO: 2), NLWPHFW (SEQ ID NO: 3), SLWPAFW (SEQ ID NO: 4),  
5 APWNSHI (SEQ ID NO: 5), APWNLHI (SEQ ID NO: 6), TLWPSYW (SEQ ID NO: 7), XXLWPXWC (SEQ ID NO: 15; X representa cualquier resto aminoácido), TLWKSYW (SEQ ID NO: 17) y ACXLWPXXWC (SEQ ID NO: 18; X representa cualquier resto aminoácido), en la que dicho péptido se une a un factor de crecimiento endotelial vascular y se expresa en un armazón resistente a la proteasa que es un inhibidor de la proteasa.
- 10 2. La composición de la Reivindicación 1, en la que dicho inhibidor de la proteasa se selecciona entre el grupo que consiste en el inhibidor de Bowman-Birk, el inhibidor de la tripsina de soja y el inhibidor de la quimotripsina Eglina.
3. La composición de la Reivindicación 2, en la que dicho armazón es el inhibidor de Bowman-Birk.
- 15 4. La composición de la Reivindicación 1, en la que dicha composición comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 22-24, tal como se muestra en la figura 13.
- 20 5. La composición de la Reivindicación 1, en la que dicho armazón comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEQ ID NO: 19, tal como se muestra en la figura 9.
6. La composición de la Reivindicación 5, en la que dicho armazón comprende las secuencias de  
25 aminoácidos CTKSNPPQC (SEQ ID NO: 20) y CALSYPAQC (SEQ ID NO: 21).
7. La composición de la Reivindicación 6, en la que dichas secuencias de aminoácidos CTKSNPPQC (SEQ ID NO: 20) y CALSYPAQC (SEQ ID NO: 21) se sustituyen por al menos un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en YNLYGWT (SEQ ID NO: 1), TLWPTFW (SEQ ID NO: 2), NLWPHFW (SEQ ID NO: 3),  
30 SLWPAFW (SEQ ID NO: 4), APWNSHI (SEQ ID NO: 5), APWNLHI (SEQ ID NO: 6), TLWPSYW (SEQ ID NO: 7) y TLWKSYW (SEQ ID NO: 17).
8. Una composición que comprende al menos un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en TLWPSYW (SEQ ID NO: 7) y TLWKSYW (SEQ ID NO: 17), en la que dicho péptido se une a un factor de  
35 crecimiento endotelial vascular.
9. Una composición cosmética o farmacéutica que comprende una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
- 40 10. La composición de la Reivindicación 9, en la que dicha composición es capaz de modular la angiogénesis.
11. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en un procedimiento de tratamiento médico.
- 45 12. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un procedimiento de tratamiento mediante la modulación de la angiogénesis, cuyo procedimiento comprende aplicar dicha composición a un sujeto en una zona en la que se desea la modulación de la angiogénesis.
- 50 13. Una composición para su uso en un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 12, en el que el procedimiento comprende la unión de dicho péptido a un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
14. Una composición para su uso en un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 13, en el que dicho factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es VEGF-A.
- 55 15. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno de la piel.
16. Una composición para su uso en un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 15, en el que  
60 dicho trastorno de la piel es un trastorno de la piel angiogénico seleccionado entre el grupo que consiste en: psoriasis, acné, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas y linfangiogénesis, síndrome de Sturge-Weber, neurofibromatosis, esclerosis tuberosa, enfermedad inflamatoria crónica y artritis.

17. Una composición para su uso en un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 16, en el que dicho trastorno de la piel es rosácea.

18. Uso de una composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la  
5 preparación de un medicamento para tratar un trastorno de la piel.

19. Uso de acuerdo con la Reivindicación 18, en el que el trastorno de la piel se selecciona entre el grupo que consiste en: psoriasis, acné, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas y linfangiogénesis, síndrome de Sturge-Weber, neurofibromatosis, esclerosis tuberosa, enfermedad inflamatoria crónica y artritis.

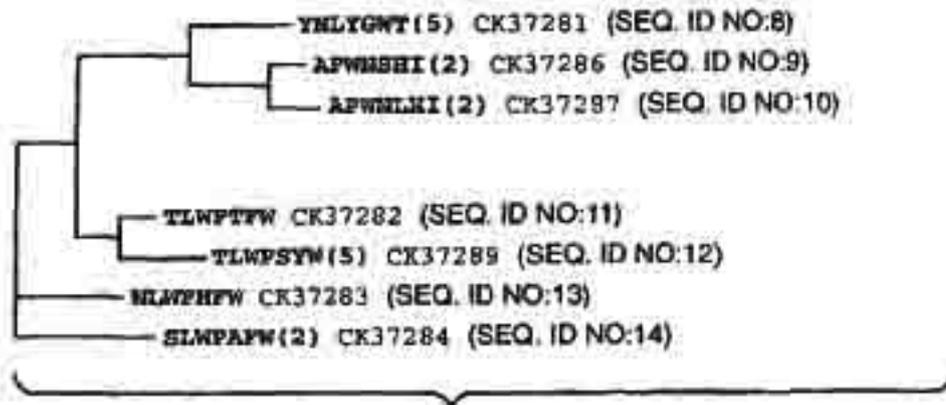
10

20. Uso de acuerdo con la Reivindicación 19, en el que el trastorno de la piel es rosácea.

**VEGF**

3er ciclo con elución ácida de la biblioteca C7C

CK37281 YNLYGWT- (SEQ. ID NO:1)  
CK37282 -TLWPTFW (SEQ. ID NO:2)  
CK37283 -NLWPHFW (SEQ. ID NO:3)  
CK37284 -SLWPAPW (SEQ. ID NO:4)  
CK37286 -APWNSHI (SEQ. ID NO:5)  
CK37287 -APWNLHI (SEQ. ID NO:6)  
CK37289 -TLWPSYW (SEQ. ID NO:7)  
Consensus LWP W



**FIG. 1**

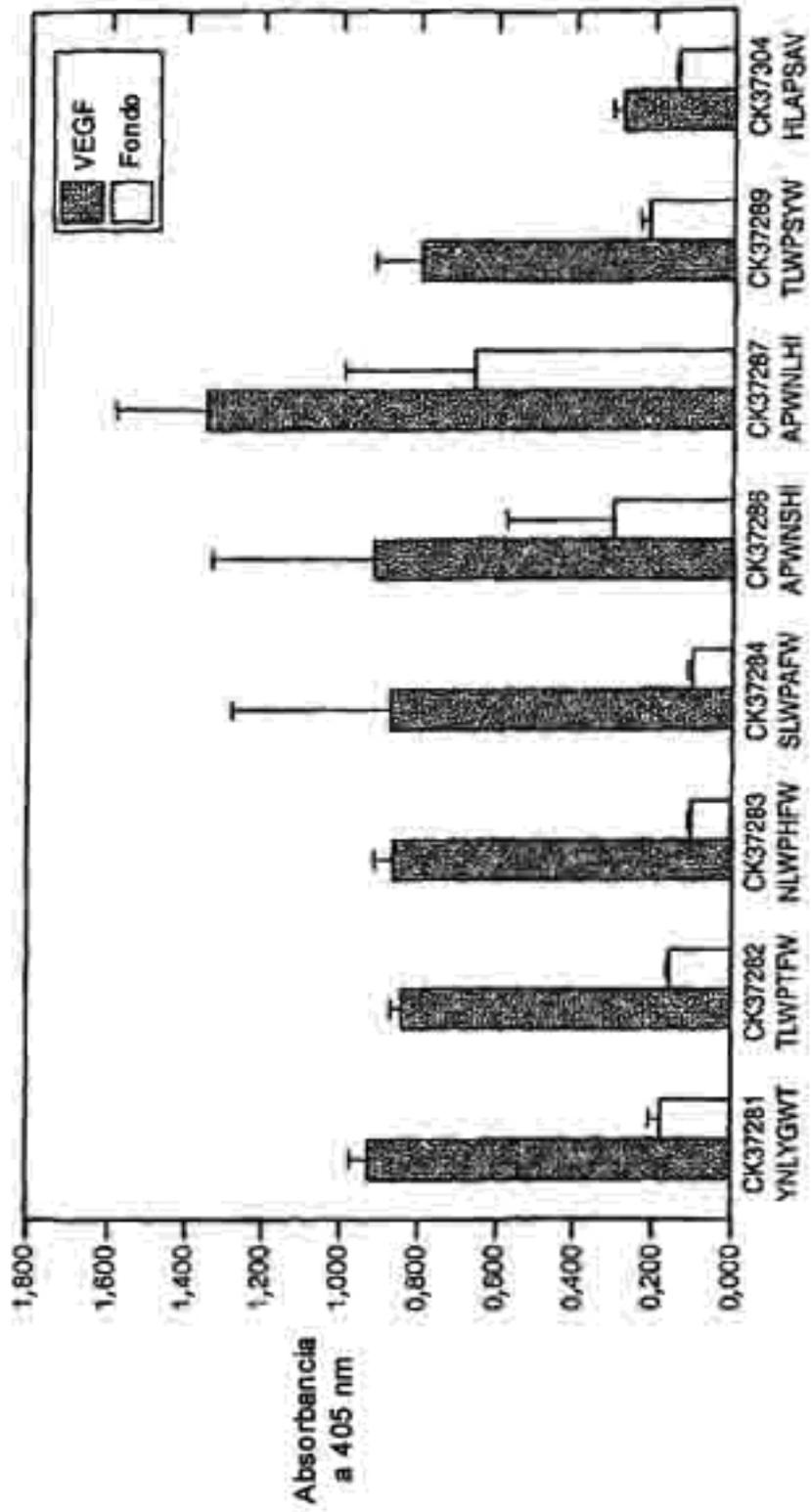
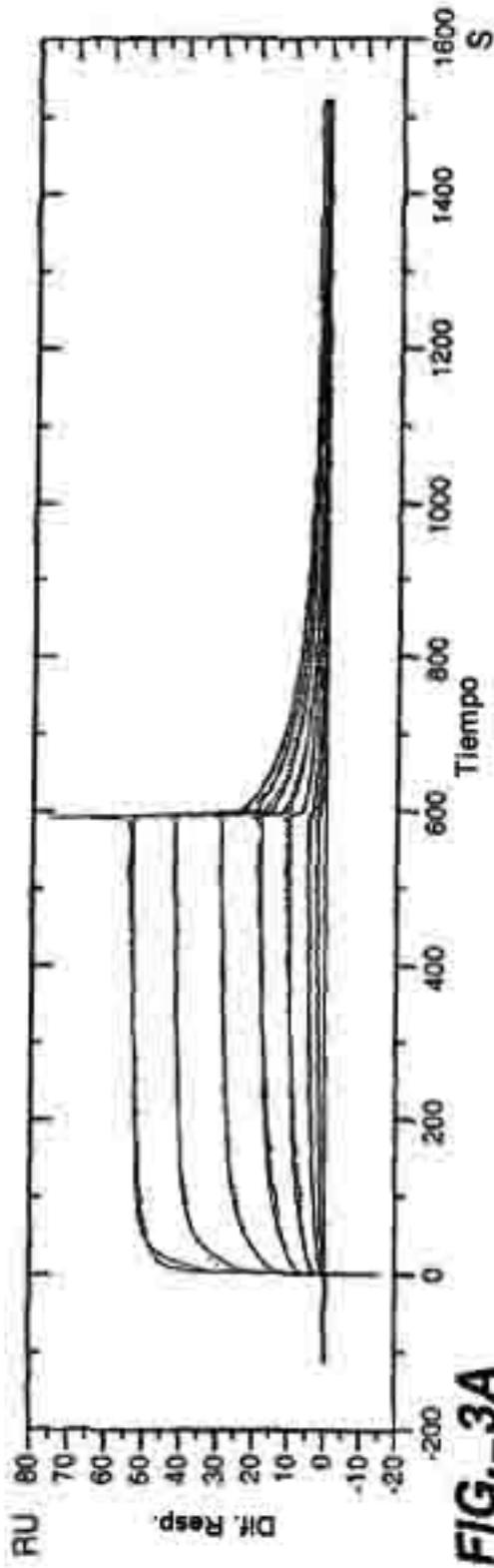
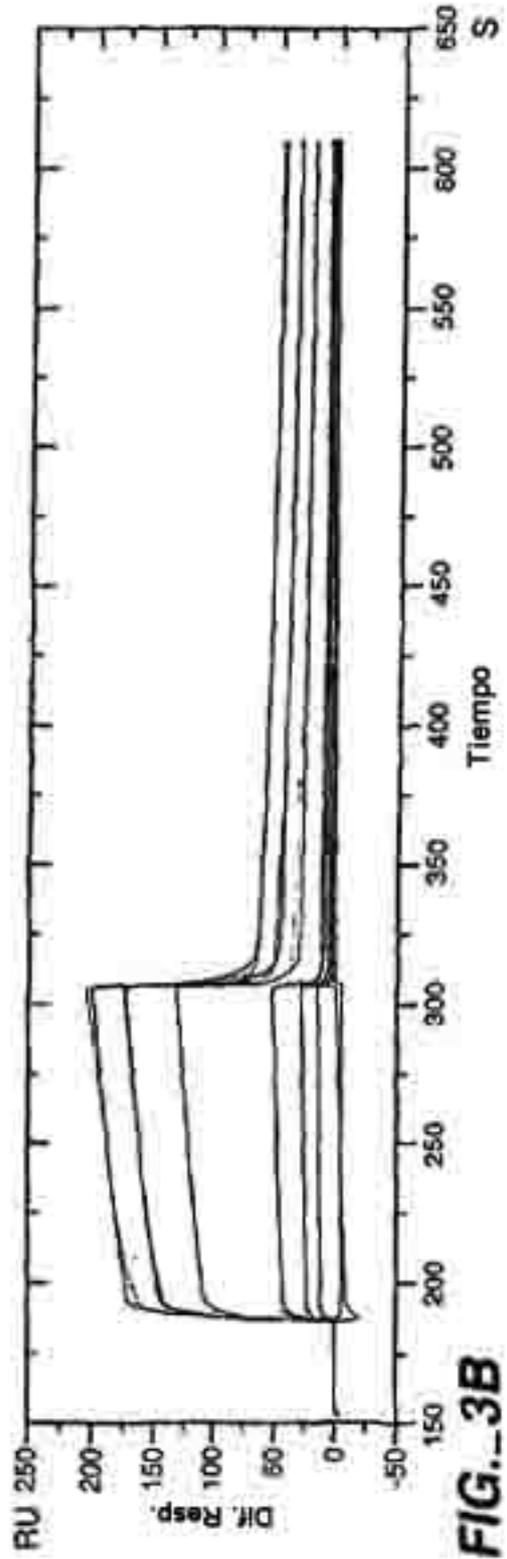


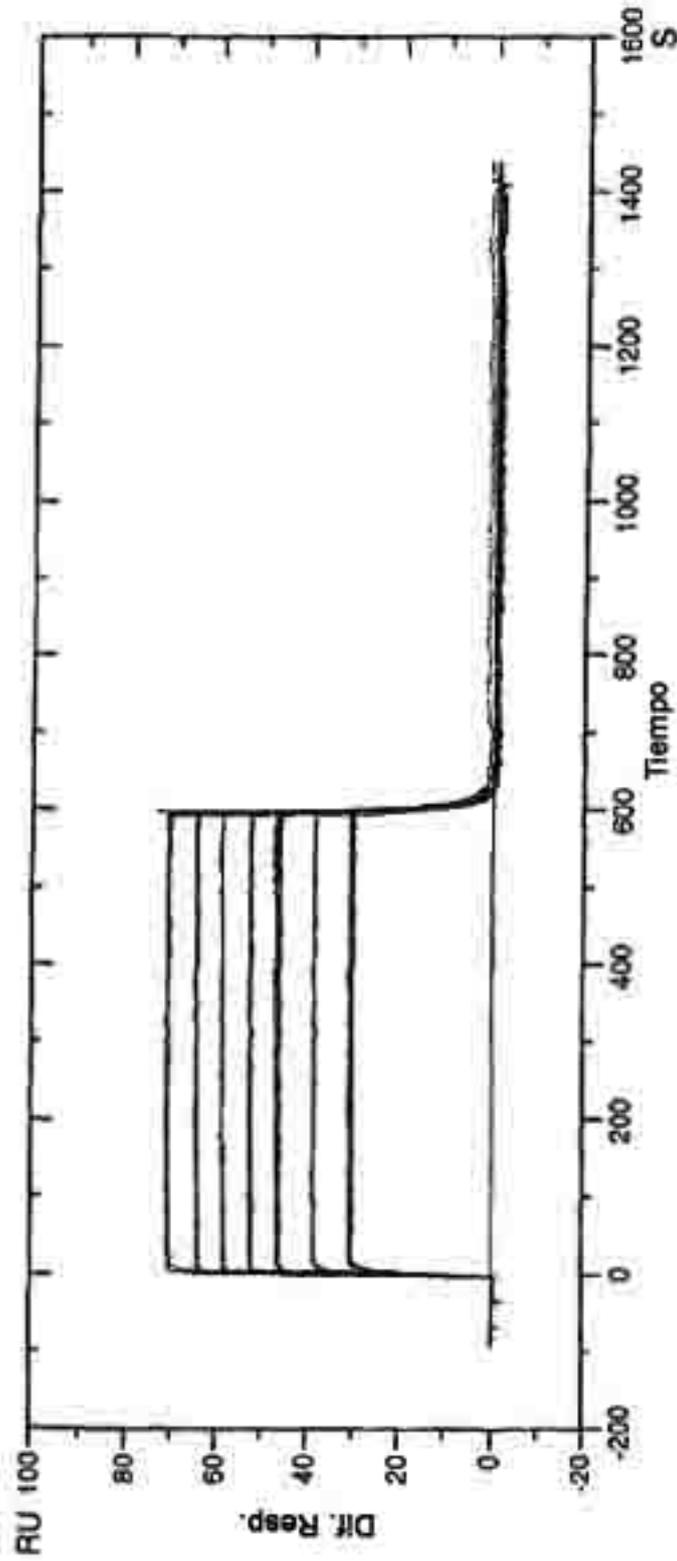
FIG.-2



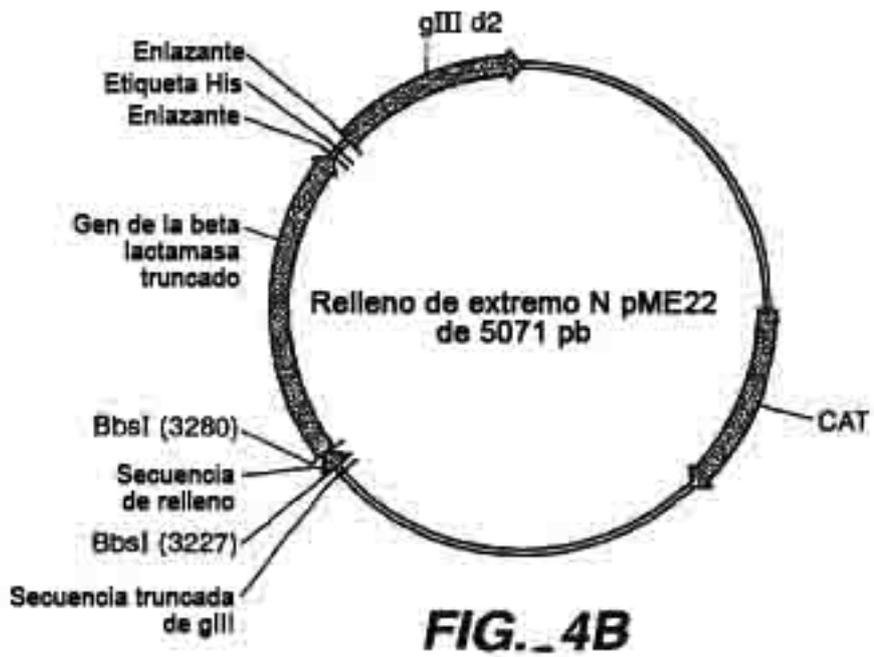
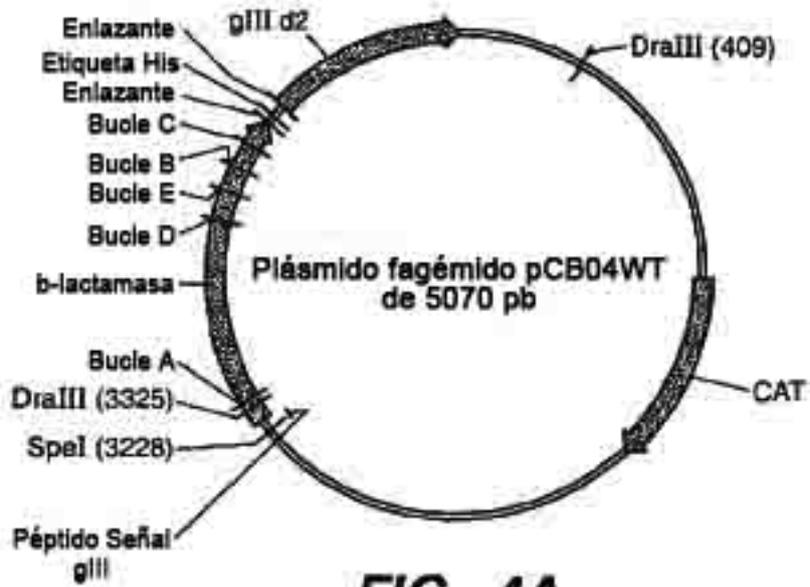
**FIG. 3A**

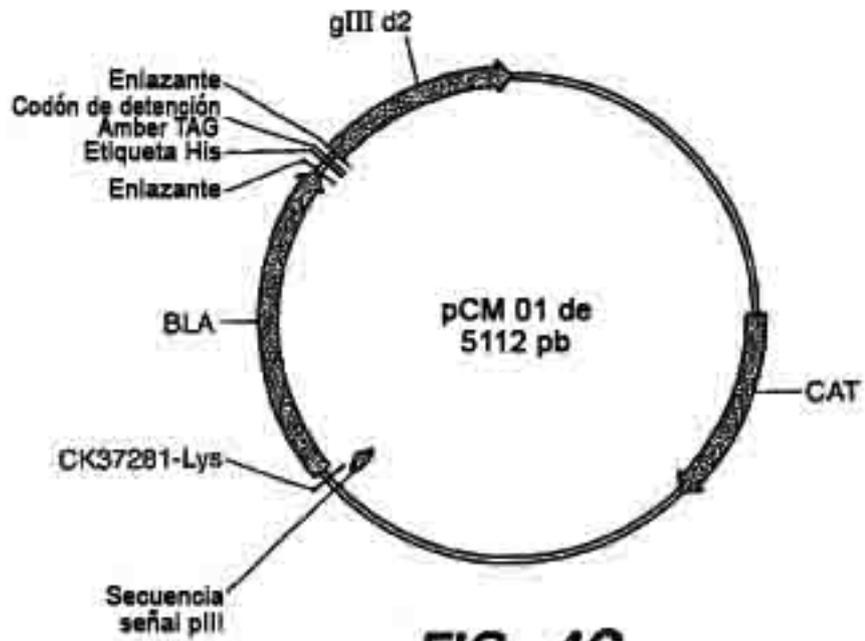


**FIG. 3B**



**FIG..3C**





**FIG.\_4C**

Figura 5

**Secuencia pIII líder-AmpC**

```

SpeI
-----
IlePro LeuValValProPheTyrSerHisSerThrProValSerGluLysGlnLeuAlaGluValValAlaAspThrIleThrProLeuMetLysAlaGlnSerValPro (126-148)
ATTCCACTAGTCGTCCTTCTTCTATCTCACTTACGCCAGTGTCAAAAACACCTGCGGGAGGTGGCGGATACGATTAACCCCTGATGAAGCACAGAGTGTTCAC
TAAAGGTGATCAGCAGGAGGAAAGATTAAGCATGATGGGTACAGTCTTTTGTGACCGCCCTCCACCGCCTTAAGCTAATGGGGCGACTACTTTCGTGTCACAAAGGT (149-169)
-----
DrallI
-----

```

**Digestión con SpeI y DrallI (nota. Segundo sitio DrallI en el vector)**

```

SpeI
-----
IlePro LeuValValProPheTyrSerHisSerThrProValSerGluLysGlnLeuAlaGluValValAlaAspThrIleThrProLeuMetLysAlaGlnSerValPro (126-148)
ATTCCACTAGTCGTCCTTCTTCTATCTCACTTACGCCAGTGTCAAAAACACCTGCGGGAGGTGGCGGATACGATTAACCCCTGATGAAGCACAGAGTGTTCAC
TAAAGGTGATCAGCAGGAGGAAAGATTAAGCATGATGGGTACAGTCTTTTGTGACCGCCCTCCACCGCCTTAAGCTAATGGGGCGACTACTTTCGTGTCACAAAGGT (149-169)
-----
DrallI
-----

```

**Sustituir con fragmento de relleno**

```

IlePro LeuValSerIleLeuSerThrAlaCysLeuGlnIleLeuLysThrGlyGlyArgGluTyrAsp <--- out of frame stuffer sequence (126-148)
b1a correct sequence frame --> AlaGluValValAlaAspThrIleThrProLeuMetLysAla GlnSerValPro (126-148)
SpeI Sall PstI BsaI
-----
ATTCCACTAGTCGTCCTTCTTCTATCTCACTTACGCCAGTGTCCAGACACCTGCTCGCATCTCGAGACTGGCGGAGGTGGCGGATACGATTAACCCCTGATGAAGCACAGAGTGTTCAC
TAAAGGTGATCAGCAGGAGGAAAGATTAAGCATGATGGGTACAGTCTTTTGTGACCGCCCTCCACCGCCTTAAGCTAATGGGGCGACTACTTTCGTGTCACAAAGGT (149-169)
-----
BsaI
-----

```

**Digir fragmento de relleno con BbsI**

```

IlePro LeuValSerIleLeuSerThrAlaCysLeuGlnIleLeuLysThrGlyGlyArgGluTyrAsp <--- out of frame stuffer sequence (126-148)
b1a correct sequence frame --> AlaGluValValAlaAspThrIleThrProLeuMetLysAlaGlnSerValPro (126-148)
SpeI Sall PstI BbsI
-----
ATTCCACTAGTCGTCCTTCTTCTATCTCACTTACGCCAGTGTCCAGACACCTGCTCGCATCTCGAGACTGGCGGAGGTGGCGGATACGATTAACCCCTGATGAAGCACAGAGTGTTCAC
TAAAGGTGATCAGCAGGAGGAAAGATTAAGCATGATGGGTACAGTCTTTTGTGACCGCCCTCCACCGCCTTAAGCTAATGGGGCGACTACTTTCGTGTCACAAAGGT (149-169)
-----
BbsI
-----

```

**Sustituir con biblioteca de extremo N**

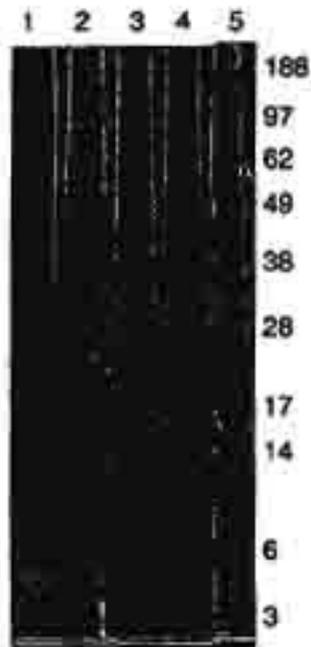
```

IlePro LeuValValProPheTyrSerHisSer AlaCysLeuGlnIleLeuLysThrGlyGlyArgGluTyrAsp <--- out of frame stuffer sequence (126-148)
ATTCCACTAGTCGTCCTTCTTCTATCTCACTTACGCCAGTGTCCAGACACCTGCTCGCATCTCGAGACTGGCGGAGGTGGCGGATACGATTAACCCCTGATGAAGCACAGAGTGTTCAC
TAAAGGTGATCAGCAGGAGGAAAGATTAAGCATGATGGGTACAGTCTTTTGTGACCGCCCTCCACCGCCTTAAGCTAATGGGGCGACTACTTTCGTGTCACAAAGGT (149-169)
-----

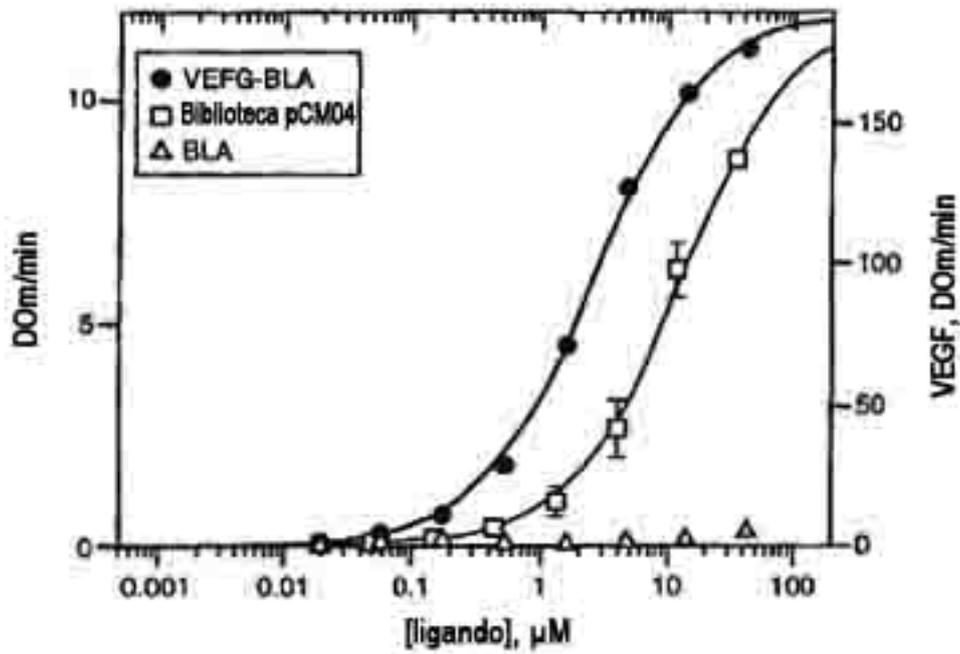
```



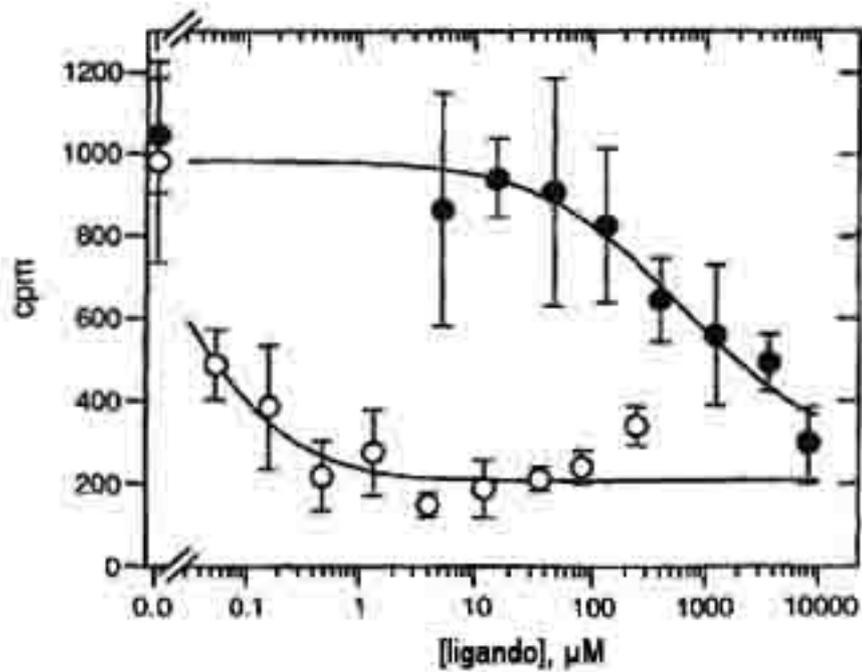
**FIG. 6**



**FIG. 10**



**FIG.\_7**



**FIG.\_8**

**EcoI**  
 M G A N L R L S K L G L L M K S D H Q N S N D  
 CCATGGGTGC GNAACCTGGT CTTCTAAGC TTGGCTGCT TATGAATCA GACCATCAG C ACAGCAATGA

**HindIII**  
 M G A N L R L S K L G L L M K S D H Q N S N D  
 CCATGGGTGC GNAACCTGGT CTTCTAAGC TTGGCTGCT TATGAATCA GACCATCAG C ACAGCAATGA

**SacI**  
 D E S S K P C C D Q C A C T K S N P P Q C R C  
 CGATGAGAGC TCTAAACCCT GTTGGATCA ATGGGCATGI ACAAAATCAA ATCCTCCAC A GTGTGGGTGT

**BsrGI**  
 D E S S K P C C D Q C A C T K S N P P Q C R C  
 CGATGAGAGC TCTAAACCCT GTTGGATCA ATGGGCATGI ACAAAATCAA ATCCTCCAC A GTGTGGGTGT

**PstI**  
 D E S S K P C C D Q C A C T K S N P P Q C R C  
 CGATGAGAGC TCTAAACCCT GTTGGATCA ATGGGCATGI ACAAAATCAA ATCCTCCAC A GTGTGGGTGT

**EcoRI**  
 S D M R L N S C H S A C K S C I C A L S Y P A Q  
 TCOGATATGC GTCTGAATTC CTGTCAATGT GCATGCAAAA GCTGTATCTG CGCCCTGAG T TATCCAGCTC

**SphI**  
 S D M R L N S C H S A C K S C I C A L S Y P A Q  
 TCOGATATGC GTCTGAATTC CTGTCAATGT GCATGCAAAA GCTGTATCTG CGCCCTGAG T TATCCAGCTC

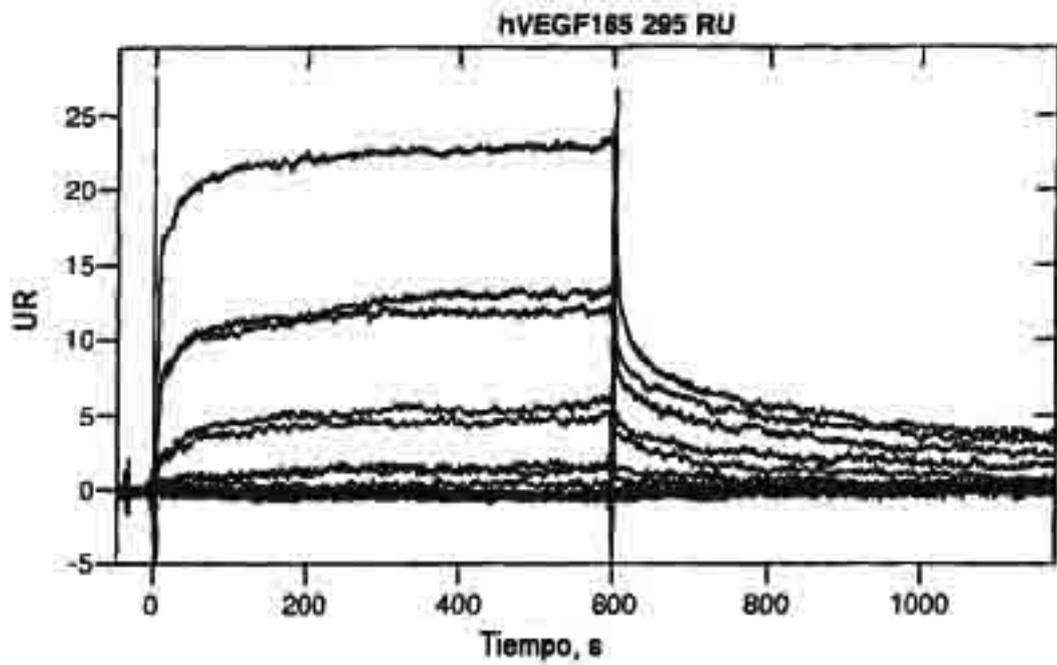
**Sali**  
 C F C V D I T D F C Y E P C K P S E D D K E N  
 AATOTTTTTG CGTCGACATC ACCGACTTCT GCTATGAGCC ATGTAAACCA ACGGAGGAC G AATAAGAGAA

**XhoI**  
 H H H H H H \*  
 CCATCATCAC CATCACCATT AACTCGAG (SEQ ID NO: 19)

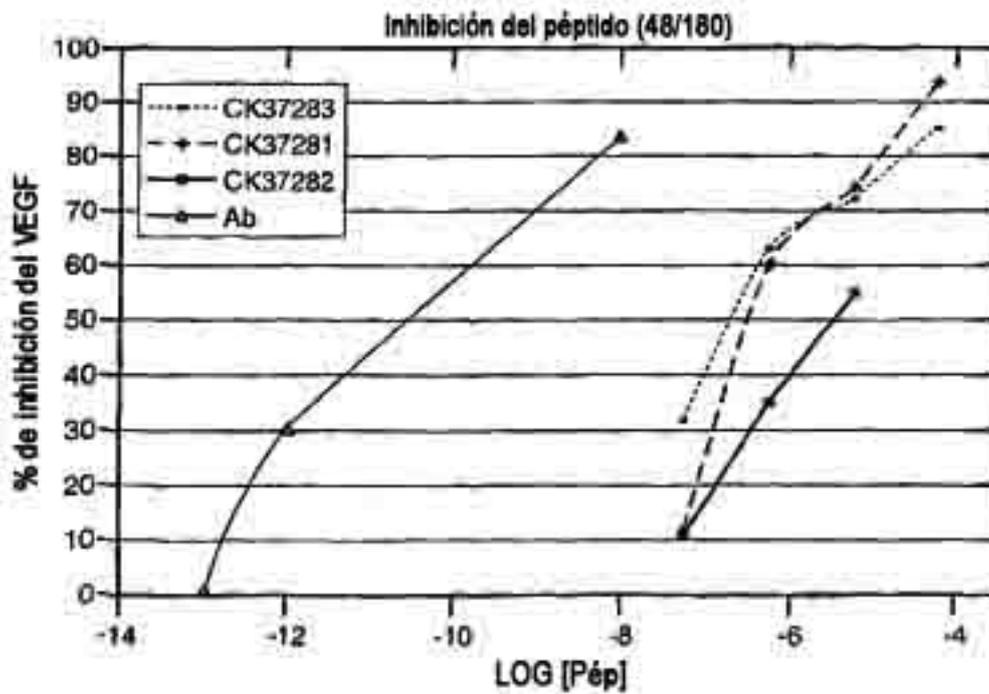
**FIG.-9**

BBI-VEG1: ddeskpcodqacynlygwtrcsdmrtnschsackscicalsyprqcfvdlldfcyepckpseddken (SEQ ID NO: 22)  
 BBI-VEGF2: ddeskpcodqaczknsppqrcsdmtrnschsbckscacynlygwtrcfvdlldfcyepckpseddken (SEQ ID NO: 23)  
 BBI-VEGF12: ddeskpcodqacacynlygwtrcsdmrtnschsackscacynlygwtrcfvdlldfcyepckpseddken (SEQ ID NO: 24)

**FIG.-13**



**FIG. 11**



**FIG. 12**