

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 268**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/198</b>	(2006.01) <b>A23L 1/48</b>	(2006.01)
<b>A21D 2/24</b>	(2006.01) <b>A23L 2/00</b>	(2006.01)
<b>A23C 9/13</b>	(2006.01) <b>A61K 8/44</b>	(2006.01)
<b>A23G 3/34</b>	(2006.01) <b>A61K 31/401</b>	(2006.01)
<b>A23L 1/20</b>	(2006.01) <b>A61P 17/00</b>	(2006.01)
<b>A23L 1/202</b>	(2006.01) <b>A61P 17/16</b>	(2006.01)
<b>A23L 1/22</b>	(2006.01) <b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>A23L 1/238</b>	(2006.01) <b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)
<b>A23L 1/24</b>	(2006.01) <b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)
<b>A23L 1/305</b>	(2006.01) <b>A61P 17/02</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2010 E 10820202 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2484355**

54 Título: **Composición que estimula la producción de laminina 332**

30 Prioridad:

**30.09.2009 JP 2009225871**  
**30.09.2009 JP 2009225872**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.08.2015**

73 Titular/es:

**SHISEIDO COMPANY, LTD. (100.0%)**  
**5-5 Ginza 7-chome Chuo-ku**  
**Tokyo 104-8010, JP**

72 Inventor/es:

**TOJO, YOSUKE;**  
**HOSOI, JUN-ICHI y**  
**MATSUMOTO, KAYO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 544 268 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

Composición que estimula la producción de laminina 332

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición que estimula la producción de laminina, que comprende D-alanina o un derivado y/o una sal de ésta, y a su uso en un método de eliminar y/o mejorar el estado de la piel que comprende la etapa de administrar aquel compuesto.

Antecedentes

10 La laminina es una proteína trómera compuesta de tres filamentos que incluyen una cadena  $\alpha$ , una cadena  $\beta$  y una cadena  $\gamma$ . Basándose en la combinación de cinco tipos de cadena  $\alpha$ , tres tipos de cadena  $\beta$  y tres tipos de cadena  $\gamma$ , se sabe que por lo menos hay quince isómeros. Entre estos, la laminina 332 ( $\alpha3\beta3\gamma2$ ), esto es, la laminina 5 de acuerdo con la nomenclatura anterior, se encuentra en gran cantidad en la membrana basal que está presente entre la epidermis y la dermis y se cree que desempeña un papel importante para mantener la estructura y función de la piel [documento no patente 1]. R ratones desprovistos de laminina 332 han demostrado separación de la epidermis de la dermis formando vesículas que presentan el fenotipo que es idéntico a la epidermólisis conjuntiva ampollosa, una enfermedad humana hereditaria, y, como resultado, la laminina 332 ha demostrado ser esencial para la adherencia de la epidermis a la dermis (documento no patente 2). Además, cuando se añade una muestra purificada de laminina 332 a un modelo equivalente de piel en la que se han cultivado queratinocitos sobre un gel de colágeno embebido con fibroblastos humanos, se intensifica la formación de membrana basal (documento no patente 3). La plasmina es una proteasa para proteínas activadas, producida por células epidérmicas y separa el péptido terminado en amino y el péptido terminado en carboxi de la subunidad  $\alpha3$  de la laminina 332 y el péptido terminado en amino de la subunidad  $\beta3$ . Cada uno de estos fragmentos separados incluye un sitio de reconocimiento para moléculas de adherencia al sustrato en la célula y un sitio de unión para el colágeno tipo VII. Así, la laminina 332 obtenida por digestión con plasmina reduce la capacidad de adherencia de los queratinocitos. Además, la laminina 332 obtenida por digestión con plasmina disminuye la afinidad con el colágeno tipo VII. Por dichas razones, se cree que el envejecimiento de la piel originado por radiación UV u otras radiaciones está relacionado con la digestión de la laminina 332 por la plasmina y con una función deteriorada de la membrana basal originada por aquélla (documento no patente 4).

30 Por lo tanto, estimulando la producción de laminina 332 hay posibilidad de eliminar y/o mejorar el envejecimiento de la piel originado por radiación UV u otras radiaciones. Con respecto a los factores que estimulan la producción de laminina 332, recientemente se ha publicado que H1F1 (documento no patente 5) y Smad4 (documento no patente 6) inducen la transcripción del gen de la subunidad  $\alpha3$ . Sin embargo, H1F1 es un regulador de la transcripción que responde a una estimulación medioambiental, como ausencia de oxígeno, y a una estimulación mecánica y también está sobrerregulada por una citoquina proinflamatoria. Smad4 es un regulador de la transcripción implicado con transducción de la señal de TGF- $\beta$ . Todos estos reguladores son proteínas de peso molecular alto y sus actividades se controlan por modificación, como fosforilación o estado de asociación con otras subunidades. Por dichas razones, es imposible que se usen para estimular la producción de laminina 332 por administración directa a un ser vivo para aportarla a células epidérmicas del tejido cutáneo. Además, como todas están reguladas por una amplia gama de factores reguladores y tienen una influencia significativa sobre funciones de un ser vivo, como respuesta inflamatoria además de estimular la producción de laminina 332, apenas se usan de manera rutinaria con inocuidad.

40 Documentos de la técnica anterior

Documentos no patentes

Documento no patente 1: Sugawara et al., Exp. Dermatol., 17 (6), 473-480 (2008)

Documento no patente 2: Aberdam et al., Nat. Genet., 6, 299 (1994)

Documento no patente 3: Amano S., SOFW J., 134 : 10 (2008)

45 Documento no patente 4: Amano S., J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 14 : 2-7 (2009)

Documento no patente 5: Fitsialos G. et al., J. Cell Sci., 121 : 2.992 (2008)

Documento no patente 6: Zboralski D. et al., BMC Cancer, 8 : 215 (2008)

El uso de D-alanina o de sus derivados para el tratamiento de la piel ha sido descrito, por ejemplo, en los documentos JP 11 060436, EP 1 884 230 y JP 2006 327972.

50

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

5 Bajo estas circunstancias, hay necesidad de desarrollar una composición que tenga la función de estimular la producción de laminina 332, específicamente una composición que tenga alta estabilidad e inocuidad y que se pueda usar de modo rutinario.

Medios para resolver el problema

La presente invención proporciona una composición que estimula la producción de laminina 332 y que comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en D-alanina y derivados y/o sales de ésta.

10 La composición que estimula la producción de laminina 332 de la presente invención se puede usar para eliminar y/o mejorar una dolencia de la piel.

Con respecto a la composición que estimula la producción de laminina 332, la dolencia de la piel comprende, pero sin carácter limitativo, fotoenvejecimiento, arrugas, piel rugosa, arrugas finas y piel seca.

La composición que estimula la producción de laminina 332 de la presente invención se puede usar como producto farmacéutico.

15 La composición que estimula la producción de laminina 332 de la presente invención se puede usar como preparación externa para la piel.

La composición que estimula producción de laminina 332 de la presente invención se puede usar como alimento.

20 La presente invención se refiere también a un método de eliminar y/o mejorar una dolencia de la piel, que comprende la etapa de administrar una composición que estimula la producción de laminina 332 y que comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en D-alanina y derivados y/o sales de ésta.

La dolencia de la piel que se elimina y/o mejora por el método al que se refiere la presente invención comprende, pero sin carácter limitativo, fotoenvejecimiento, arrugas, piel rugosa, arrugas finas y piel seca.

De acuerdo con el método de la presente invención, la composición que estimula la producción de laminina 332 puede ser un producto farmacéutico.

25 De acuerdo con el método de la presente invención, la composición que estimula la producción de laminina 332 puede ser una preparación externa para la piel.

Con respecto al método al que se refiere la presente invención, la composición que estimula la producción de laminina 332 de la presente invención se puede usar como composición alimenticia.

30 En la presente memoria, el término "sal" de D-alanina indica cualquier sal, incluidas una sal metálica y una sal de amina, con la condición de que no se deteriore el efecto estimulante de la D-alanina sobre la producción de laminina 332. La sal metálica puede comprender una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo, etc. La sal de amina puede comprender una sal de trietilamina, una sal de bencilamina, etc.

35 En la presente memoria, el término "derivados" de D-alanina indica una molécula de D-alanina que está unida covalentemente a cualquier grupo atómico mediante su grupo amino, grupo carboxi o cadena lateral, con la condición de que no se deteriore el efecto estimulante de la D-alanina sobre la producción de laminina 332. El grupo atómico comprende, pero sin carácter limitativo, un grupo protector, como el grupo N-fenilacetilo y el grupo 4,4'-dimetoxitritilo (DMT); un biopolímero, como una proteína, un péptido, un sacárido, un lípido y un ácido nucleico; un polímero sintético, como un poliestireno, un polietileno, un polivinilo o un poliéster; y un grupo funcional, como un grupo éster. El grupo éster puede comprender, por ejemplo, un éster alifático, como un éster de metilo y un éster de etilo; y un éster aromático.

45 Un aminoácido tiene isómeros ópticos, que son la forma L y la forma D. Una proteína natural tiene L-aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y sólo se emplean L-aminoácidos, excluidas algunas excepciones, como la pared de células bacterianas. Por lo tanto, se ha considerado que en los mamíferos, incluido el ser humano, sólo están presentes L-aminoácidos y sólo se utilizan L-aminoácidos [Kinouchi T. et al., Tanpakushitsu Kakusan Koso (Protein, Nucleic Acid and Enzyme), 50: 453-460 (2005), Principles of Biochemistry de Lehninger, volumen 1, 2ª edición, (1993), páginas 132-147, traducción al japonés, Hirokawa Shoten Ltd., Bioquímica de Harper, versión original. 22ª edición (1991), páginas 21-30, traducción al japonés, Maruzen Co. Ltd. En consecuencia, durante largo tiempo sólo se han empleado en la mayoría de los casos L-aminoácidos.

50 Casos excepcionales en los que se emplean D-aminoácidos son, por ejemplo, el caso de usarlos como materia prima para antibióticos producidos por un microorganismo y el caso de un aditivo alimenticio que utiliza un D-aminoácido en un mezcla de DL-aminoácidos con el fin de reducir el coste de fraccionar sólo un L-aminoácido de

una mezcla de los aminoácidos L y D, que se obtienen en cantidades equimolares sintetizando los aminoácidos. No obstante, no hay ningún caso de usar industrialmente sólo D-aminoácidos como sustancias bioactivas.

5 La D-serina y el ácido D-aspártico tienen una proporción alta de la forma D y, por lo tanto, se han realizado muchos estudios en comparación con otros aminoácidos. La D-serina está localizada en el cerebro y en el hipocampo y se conoce como factor regulador para el receptor de NMDA. El ácido D-aspártico está localizado en los testículos y en el cuerpo pineal y se sabe que está implicado con el control de la secreción de hormonas (publicación no examinada de la patente japonesa número 2005-3.558). Sin embargo, no se ha aclarado la actividad fisiológica de la D-alanina en la piel.

10 Como se describe en los siguientes ejemplos, el efecto estimulante de la D-alanina sobre la producción de laminina 332 no ha sido conocido hasta ahora. Así, la composición que estimula la producción de laminina 332 de la presente invención que contiene D-alanina es una nueva invención.

15 Recientemente se ha publicado que se dejó ingerir libremente a ratones ddY una solución acuosa 10 mM de un D-aminoácido durante dos semanas y se examinó después la concentración del D-aminoácido en cada órgano, con un resultado de 3 a 1.000 pmol por glándula en el cuerpo pineal y de 2 a 500 nmol por gramo húmedo en el tejido cerebral [Morikawa A. et al., Amino Acids, 32 : 13-20 (2007)]. Basándose en lo anterior, el límite inferior de la ingesta diaria de D-alanina y D-hidroxiprolina que están contenidas en la composición de la presente invención se calcula como se describe más adelante.

20 La D-alanina de la presente invención tiene el efecto de estimular la producción de laminina 332 en queratinocitos epidérmicos humanos cultivados dentro de un intervalo de concentración de 0,1 a 1 µM, como se describe en los siguientes ejemplos. Así, la cantidad de D-alanina que está contenida en la composición para mejorar la dolencia de la piel, la preparación externa para la piel o la composición alimenticia de la presente invención puede ser cualquier contenido con la condición de que la D-alanina en el intervalo de concentración antes mencionado se aporte *in vivo* a los fibroblastos de un tejido cutáneo. En cuanto a la preparación externa para la piel de la presente invención, el contenido de D-alanina puede ser de 0,000015 a 50% en peso o hasta la concentración máxima en peso que pueda ser formulada, en la composición total de la invención. Específicamente, cuando la composición es una preparación externa para la piel, el contenido de D-alanina es preferiblemente 0,00003 a 30% en peso y lo más preferiblemente 0,0003 a 3% en peso. Cuando la composición de la presente invención es un producto farmacéutico de un agente interno, el contenido de D-alanina puede estar dentro del intervalo de 0,00001 a 100% en peso. Cuando la composición de la presente invención es un agente interno, el contenido de D-alanina es preferiblemente 0,00002 a 80% en peso y lo más preferiblemente 0,0002 a 60% en peso. Además, el límite inferior de una ingesta diaria de D-alanina que está contenida en la composición de la presente invención puede ser 0,01 ng, preferiblemente 0,1 ng y más preferiblemente 1 ng por kg de peso corporal.

35 La composición de la presente invención puede comprender también uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables, además de D-alanina, sales de D-alanina y/o derivados de D-alanina capaces de liberar *in vivo* D-alanina por enzimas metabolizadoras del fármaco, etc., con la condición de que no se deteriore el efecto estimulante de la D-alanina sobre la producción de laminina 332. Dichos aditivos comprenden, pero sin carácter limitativo, un diluyente, una carga, un aglutinante y un adhesivo, un lubricante, un deslizante, un plastificante, un desintegrante, un disolvente portador, un agente tampón, un colorante, un agente saboreante, un edulcorante, un conservante y un estabilizador, un adsorbente, así como otros aditivos farmacéuticos conocidos por los expertos en la técnica.

40 La composición de la presente invención se puede preparar usando, como ingrediente activo, sólo D-alanina, sales de D-alanina y/o derivados de D-alanina capaces de liberar *in vivo* D-alanina por enzimas metabolizadores del fármaco, etc. Sin embargo, dentro del intervalo en el que no se deteriore el efecto de la presente invención, la composición puede ser formulada apropiadamente con otros componentes que se usan para preparaciones externas para la piel, como cosméticos que comprenden cuasifármacos y productos farmacéuticos, si fueran necesarios. Ejemplos de estos otros componentes (esto es, componentes opcionales añadidos) comprenden un aceite, un agente tensioactivo, un polvo, un colorante, agua, alcoholes, un agente espesante, un agente quelante, siliconas, un antioxidante, un agente absorbente de radiaciones UV, un agente humectante, un agente saboreante, diversos componentes farmacéuticamente eficaces, un conservante, un agente de ajuste del pH y un agente neutralizante.

50 La forma de dosificación de la composición que estimula la producción de laminina 332 de la presente invención que se usa para eliminar y/o mejorar una dolencia de la piel (denominada en lo sucesivo "agente para mejorar una dolencia de la piel") puede ser una cualquiera que se use comúnmente para composiciones de cuasifármacos y composiciones farmacéuticas que comprenden una preparación externa para la piel, como una pomada, una crema, una emulsión, una loción, un apósito, un gel y un parche; una preparación oral, como un polvo, gránulos, una cápsula blanda y un comprimido; una preparación nasal, como un spray nasal, y una solución inyectable.

55 La forma de dosificación de la preparación externa para la piel de acuerdo con la presente invención no está limitada específicamente, siempre que se use convencionalmente como preparación externa para la piel, y comprende una pomada, una crema, una emulsión, una loción, un apósito, un gel y un parche.

La composición alimenticia de la presente invención puede comprender también un agente acondicionador, un colorante, un conservante y otros componentes que se pueden usar como producto alimenticio siempre que no se deteriore el efecto estimulante de la producción de laminina 332 de la D-alanina, sales de D-alanina, y/o derivados de D-alanina capaces de liberar *in vivo* D-alanina por enzimas metabolizadoras de fármacos, etc.

5 La composición alimenticia de la presente invención puede ser una cualquiera empleada convencionalmente como composición alimenticia y comprende, pero sin carácter limitativo, un caramelo, una galleta, una pasta de semillas, un aliño francés, una mayonesa, un pan francés, una salsa de soja, yogur, polvo seco de condimento para arroz, salsa/condimento para natto (soja japonesa fermentada), natto, vinagre negro no refinado, etc.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-alanina sobre células KC.

La figura 2 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-alanina sobre la producción de laminina 332 en células KC.

La figura 3 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-alanina sobre células HaCaT.

La figura 4 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-hidroxi prolina sobre células HaCaT (información comparativa).

15 La figura 5 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-alanina sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT.

La figura 6 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-hidroxi prolina sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT (información comparativa).

La figura 7 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-hidroxi prolina sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT.

20 La figura 8 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-hidroxi prolina a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT (información comparativa).

La figura 9 es una gráfica que ilustra el efecto del ácido D-aspartico a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT (información comparativa).

25 La figura 10 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-asparagina a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT (información comparativa).

La figura 11 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-prolina a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT (información comparativa).

La figura 12 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-serina a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT (información comparativa).

30 Descripción de realizaciones

Los ejemplos de la presente invención descritos a continuación pretenden sólo ejemplificar la presente invención. Sólo los ejemplos relativos a la D-alanina o a sales o derivados de ésta están comprendidos por la presente invención.

### Ejemplos

35 Ejemplo 1

1. Producción estimulada de laminina 332 por adición de alanina e hidroxiprolina

1-1. Materiales y métodos

(1) Células

40 Se usaron células HaCaT obtenidas de piel humana [H. Hans et al., Experimental Cell Research, 239 : 399 (1998)] y células KC obtenidas de queratocitos humanos (Sanko Junyaku Co. Ltd.; fabricante: Lonza Walkersville Inc.). Se inocularon las células en una placa de 24 pocillos para tener  $4 \times 10^4$  células por pocillo. Se cultivaron después las células durante 24 horas en un medio de cultivo de células [D-MEM (1 gramo de glucosa/litro)], fabricado por Wako Pure Chemical Industries Ltd.), que había sido suplementado con 0,1% de seroalbúmina bovina (denominado en lo sucesivo "medio estándar") en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y vapor de agua saturado a 37°C.

45

## (2) Adición de alanina e hidroxiprolina

Posteriormente, se cambió el medio por el medio estándar al que se había añadido L- o D-alanina 1  $\mu\text{M}$  (0,5  $\mu\text{M}$  de cada una), L- o D-hidroxiprolina 1  $\mu\text{M}$  (0,5  $\mu\text{M}$  de cada una), y se cultivó durante 24 horas. Además, como control negativo se empleó el medio estándar antes descrito al que no se había añadido alanina ni hidroxiprolina. La D-hidroxiprolina usada en este ejemplo fue 4-cis-D-hidroxiprolina.

## (3) Cuantificación de la cantidad producida de laminina 332

Después de haberse completado el cultivo celular, el medio de cultivo se recogió y centrifugó a 3.000 rpm durante cinco minutos. Se midió la concentración de laminina 332 en el líquido sobrenadante mediante el método ELISA [Amano S. et al., J. Immunol. Methods, 224 : 161 (1999)]. El método ELISA usado fue del tipo sándwich, que utiliza conjugado biotinilado de BM165, esto es, un anticuerpo monoclonal contra la cadena  $\alpha 3$  de la laminina 5, y 6F12, esto es, un anticuerpo monoclonal contra la cadena  $\beta 3$  de la laminina 5, y se realizó la detección utilizando avidina D marcada con una peroxidasa de ben (Vector Laboratories; número de catálogo A-2004). Como control se usó PBS.

## (4) Cuantificación del número de células viables

Después de recoger el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS y se añadió azul Alamar<sup>®</sup> (marca comercial registrada de Biosource International Inc.) hasta conseguir una concentración final de 10%. Dos horas más tarde, se midió la intensidad de la fluorescencia de la solución de azul Alamar de acuerdo con los métodos de Ahmed S. A. et al. [J. Immunol. Method., 170, 211-224 (1994)] y con las instrucciones proporcionadas por el fabricante, con una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

## 1-2. Resultados

## (1) Cuantificación del número de células KC viables

La figura 1 muestra los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir alanina sobre la proliferación de células KC. Las barras de errores para cada condición experimental indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento tres veces bajo condiciones idénticas.

La intensidad relativa de la fluorescencia del azul Alamar<sup>®</sup> como control negativo fue 50 en las células KC. La intensidad de la fluorescencia de las células KC cultivadas en el medio al que se había añadido L-alanina 1  $\mu\text{M}$ , en el medio al que se había añadido D-alanina 1  $\mu\text{M}$  y en el medio al que se había añadido L- y D-alanina 0,5  $\mu\text{M}$  de L- y D-alanina (de cada una) fue 40, 45 y 50, respectivamente. Comparada con el control negativo, la intensidad de la fluorescencia del azul Alamar<sup>®</sup> de las células KC cultivadas en el medio al que se había añadido alanina no mostró ninguna diferencia significativa mediante el ensayo de Tukey-Kramer. Así, se encontró que la L- y D-alanina no tienen citotoxicidad contra células KC.

## (2) Producción de laminina 332 en células KC

La figura 2 muestra los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir alanina en la producción de laminina 332 en células KC. En la figura 2, la línea vertical representa los valores obtenidos dividiendo la absorbancia obtenida en las mediciones del ensayo ELISA, que era proporcional a la concentración de laminina 332 en el cultivo sobrenadante de cada pocillo, por la intensidad de la fluorescencia del azul Alamar<sup>®</sup>, que era proporcional al número de células presentes en cada pocillo (denominado en lo sucesivo "valor relativo de la concentración de laminina 332 comparada con el número de células"). Las barras de errores para cada condición experimental indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento tres veces bajo condiciones idénticas. Además, el doble asterisco (\*\*) indica que p es menor que 1% en el ensayo de Tukey-Kramer.

El valor relativo de la concentración de laminina 332 comparada con el número de células fue 0,35 en el control negativo. El valor relativo de la concentración de laminina 332 comparada con el número de células en las células KC cultivadas en el medio al que se había añadido L-alanina 1  $\mu\text{M}$ , en el medio al que se había añadido D-alanina 1  $\mu\text{M}$  y en el medio al que se había añadido L- y D-alanina 0,5  $\mu\text{M}$  (de cada una) fue 0,40, 0,50 y 0,45, respectivamente. Comparada con el control negativo, la adición de D-alanina a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  originó un valor de p menor que 1% en el ensayo de Tukey-Kramer, demostrando una diferencia significativa. Así, quedó demostrada la producción estimulada de laminina 332 en células KC.

## (3) Cuantificación del número de células HaCaT viables

Las figuras 3 y 4 muestran los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir alanina o hidroxiprolina sobre la proliferación de células HaCaT. En lo sucesivo, D-hidroxiprolina (D-Hyp) indica 4-cis-D-hidroxiprolina. Las barras de errores para cada condición experimental indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento tres veces bajo condiciones idénticas.

La intensidad de la fluorescencia del azul Alamar<sup>®</sup> usado como control negativo fue 300 en las células HaCaT. La intensidad de la fluorescencia de las células HaCaT cultivadas en el medio al que se había añadido L-alanina 1  $\mu\text{M}$ ,

en el medio al que se había añadido D-alanina 1  $\mu\text{M}$  y en el medio al que se había añadido L- y D-alanina 0,5  $\mu\text{M}$  (de cada una) fue en todos los casos 250 (figura 3). La intensidad de la fluorescencia de las células HaCaT cultivadas en el medio al que se había añadido D-hidroxirolina 1  $\mu\text{M}$ , en el medio al que se había añadido D-hidroxirolina 1  $\mu\text{M}$  y en el medio al que se había añadido L- y D-hidroxirolina 0,5  $\mu\text{M}$  (de cada una) fue en todos los casos 280 (figura 4). Comparada con el control negativo, la intensidad de la fluorescencia del azul Alamar<sup>®</sup> de las células HaCaT en el medio al que se había añadido alanina o D-hidroxirolina no mostró ninguna diferencia significativa en el ensayo de Tukey-Kramer. Así, se encontró que la L- y D-alanina y la L- y D-hidroxirolina tampoco tienen citotoxicidad contra las células HaCaT.

#### (4) Producción de laminina 332 en células HaCaT con adición de alanina

La figura 5 muestra los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir alanina en la producción de laminina en células HaCaT. En la figura 5, la línea vertical de la gráfica representa los valores relativos de la concentración de laminina 332 comparada con el número de células presentes en el cultivo sobrenadante en cada pocillo. Las barras de errores para cada condición experimental indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento tres veces bajo condiciones idénticas. Además, el doble asterisco (\*\*) indica que p es menor que 1% y el asterisco (\*) indica que p es menor que 5% en el ensayo F de Scheffe.

El valor relativo de la concentración de laminina 332 comparada con el número de células fue 0,04 en el control negativo. El valor relativo de la concentración de laminina 332 comparada con el número de células en las células HaCaT cultivadas en el medio al que se había añadido D-alanina 1  $\mu\text{M}$ , en el medio al que se había añadido D-alanina 1  $\mu\text{M}$  y en el medio al que se había añadido L- y D- alanina 0,5  $\mu\text{M}$  (de cada una) fue 0,07, 0,11 y 0,10, respectivamente. Comparada con el control negativo, la adición de D-alanina a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  originó un valor p menor que 1% en el ensayo F de Scheffe. Comparada con el control negativo, la adición de una mezcla que contiene D-alanina y L-alanina a la concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  originó un valor p menor que 5% en el ensayo F de Scheffe. El valor p fue menor que 5% en el ensayo F de Scheffe entre D-alanina 1  $\mu\text{M}$  y L-alanina 1  $\mu\text{M}$ , mostrando así todas diferencias significativas. Así, lo mismo que las células KC, también quedó demostrada la producción de laminina 332 estimulada por adición de D-alanina en las células HaCaT.

#### (5) Producción de laminina en células HaCaT con adición de hidroxirolina (datos comparativos)

La figura 6 muestra los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir hidroxirolina sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT. En la figura 6, la línea vertical representa los valores relativos de la concentración de laminina 332 comparada con el número de células presentes en el cultivo sobrenadante en cada pocillo. Las barras de errores para cada condición experimental indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento tres veces bajo condiciones idénticas.

El valor relativo de la concentración de laminina 332 comparada con el número de células fue 0,04 en el control negativo. Los valores relativos de la concentración de laminina 332 comparada con el número de células HaCaT cultivadas en el medio al que se había añadido L-hidroxirolina 1  $\mu\text{M}$ , en el medio al que se había añadido D-hidroxirolina 1  $\mu\text{M}$  y en el medio al que se había añadido L- y D-hidroxirolina 0,5  $\mu\text{M}$  (de cada una) fue 0,05, 0,065 y 0,06, respectivamente.

### Ejemplo 2

#### 2. Comparación de la cantidad producida de laminina 332 con adición de diversos aminoácidos

##### 2-1. Materiales y métodos

Se realizó un cultivo celular de la misma manera que en el ejemplo 1 usando células HaCaT. Después, se cambió el medio por el medio estándar al que se había añadido aminoácidos, como L- o D-alanina, L- o D-hidroxirolina, ácido L- o D-aspartico, L- o D-asparagina, L- o D-prolina o L- o D-serina a concentraciones de 10, 100 o 1.000 nM, y se cultivó durante 24 horas. Como control negativo, se usó el medio estándar al que no se había añadido ningún aminoácido. La D-hidroxirolina usada en este ejemplo fue 4-cis-D-hidroxirolina. Se midió la cantidad producida de laminina 332 de la misma manera que en el ejemplo 1. No se observó citotoxicidad en los experimentos en los que se habían añadido aminoácidos a las diversas concentraciones y, para cada condición experimental, se comparó la cantidad de laminina 332 producida en las células.

##### 2-2. Resultados

###### (1) Adición de alanina

La figura 7 muestra los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir alanina a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT. En la figura 7, la línea vertical representa las concentraciones de laminina 332 (ng/ml) en el cultivo sobrenadante en cada pocillo. Para cada condición experimental, las barras de errores indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento cuatro veces bajo condiciones idénticas.

La concentración de laminina 332 fue 1,7 ng/ml en el control negativo. La concentración de laminina 332 en las células HaCaT cultivadas en el medio al que se había añadido alanina a las concentraciones de 10, 100 y 1.000 nM fue 1,7, 2,3 y 2,8 ng/ml, respectivamente, en el caso de la L-alanina, y 1,7, 3,4 y 4,8 ng/ml, respectivamente, en el caso de la D-alanina. Basándose en estos resultados, se encontró que la D-alanina puede estimular la producción de laminina 332 a una concentración de 10 ng/ml o mayor.

(2) Adición de hidroxiprolina (datos comparativos)

La figura 8 muestra los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir hidroxiprolina a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT. En la figura 8, la línea vertical de la gráfica representa las concentraciones de laminina 332 (ng/ml) en el cultivo sobrenadante en cada pocillo. Para cada condición experimental, las barras de errores indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento cuatro veces bajo condiciones idénticas.

La concentración de laminina 332 fue 1,5 ng/ml en el control negativo. La concentración de laminina 332 en las células HaCaT cultivadas en el medio al que se había añadido hidroxiprolina a las concentraciones de 10, 100 y 1.000 nM fue 1,5, 2,3 y 2,7 ng/ml, respectivamente, en el caso de la L-hidroxiprolina, y 1,5, 3,3 y 4,4 ng/ml, respectivamente, en el caso de la D-hidroxiprolina. Basándose en estos resultados, se encontró que la D-hidroxiprolina puede estimular la producción de laminina 332 a una concentración de 100 ng/ml o mayor.

(3) Adición de ácido aspártico (datos comparativos)

La figura 9 muestra los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir ácido aspártico a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT. En la figura 9, la línea vertical de la gráfica representa las concentraciones de laminina 332 (ng/ml) en el cultivo sobrenadante en cada pocillo. Para cada condición experimental, las barras de errores indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento cuatro veces bajo condiciones idénticas.

La concentración de laminina 332 fue 1,7 ng/ml en el control negativo. La concentración de laminina 332 en las células HaCaT cultivadas en el medio al que se había añadido ácido aspártico a las concentraciones de 10, 100 y 1.000 nM fue 1,8, 1,8 y 2,0 ng/ml, respectivamente, en el caso del ácido L-aspártico, y 1,9, 1,9 y 1,7 ng/ml, respectivamente, en el caso del ácido D-aspártico. Basándose en estos resultados, se encontró que los ácidos L- y D-aspártico no estimulan la producción de laminina 332.

(4) Adición de asparagina (datos comparativos)

La figura 10 muestra los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir asparagina a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT. En la figura 10, la línea vertical de la gráfica representa las concentraciones de laminina 332 (ng/ml) en el cultivo sobrenadante en cada pocillo. Para cada condición experimental, las barras de errores indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento cuatro veces bajo condiciones idénticas.

La concentración de laminina 332 fue 1,5 ng/ml en el control negativo. La concentración de laminina 332 en las células HaCaT cultivadas en el medio al que se había añadido asparagina a las concentraciones de 10, 100 y 1.000 nM fue 1,6, 1,5 y 1,6 ng/ml, respectivamente, en el caso de la L-asparagina, y 1,5, 1,5 y 1,5 ng/ml, respectivamente, en el caso de la D-asparagina. Basándose en estos resultados, se encontró que la L- y D-asparagina no estimulan la producción de laminina 332.

(5) Adición de prolina (datos comparativos)

La figura 11 muestra los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir prolina a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT. En la figura 11, la línea vertical de la gráfica representa las concentraciones de laminina 332 (ng/ml) en el cultivo sobrenadante en cada pocillo. Para cada condición experimental, las barras de errores indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento cuatro veces bajo condiciones idénticas.

La concentración de laminina 332 fue 1,8 ng/ml en el control negativo. La concentración de laminina 332 en las células HaCaT cultivadas en el medio al que se había añadido prolina a las concentraciones de 10, 100 y 1.000 nM fue 1,8, 1,9 y 1,9 ng/ml, respectivamente, en el caso de la L-prolina, y 2,0, 1,9 y 1,9 ng/ml, respectivamente, en el caso de la D-prolina. Basándose en estos resultados, se encontró que la L- y D-prolina no estimulan la producción de laminina 332.

(6) Adición de serina (datos comparativos)

La figura 12 muestra los resultados experimentales obtenidos examinando el efecto de añadir serina a diversas concentraciones sobre la producción de laminina 332 en células HaCaT. En la figura 12, la línea vertical de la gráfica representa las concentraciones de laminina 332 (ng/ml) en el cultivo sobrenadante en cada pocillo. Para cada

condición experimental, las barras de errores indican las desviaciones típicas de valores medidos experimentalmente obtenidos repitiendo el experimento cuatro veces bajo condiciones idénticas.

5 La concentración de laminina 332 fue 1,7 ng/ml en el control negativo. La concentración de laminina 332 en las células HaCaT cultivadas en el medio al que se había añadido serina a las concentraciones de 10, 100 y 1.000 nM fue 1,8, 1,9 y 1,9 ng/ml, respectivamente, en el caso de la L-serina, y 1,8, 1,8 y 1,8 ng/ml, respectivamente, en el caso de la D-serina. Basándose en estos resultados, se encontró que la L- y D-serina no estimulan la producción de laminina 332.

#### Conclusiones

10 Basándose en los resultados experimentales obtenidos en los ejemplos 1 y 2, se observó el efecto estimulante de la D-alanina y D-hidroxiprolina sobre la producción de laminina 332. Sin embargo, no observó dicho efecto con el ácido aspártico, asparagina, prolina y serina. Como resultado, se demostró que la D-alanina y D-hidroxiprolina se pueden usar para eliminar y/o mejorar una dolencia de la piel por estimular la producción de laminina 332, lo cual desempeña un papel importante para mantener la estructura y función de la membrana basal. Sin embargo, la invención está limitada al uso de D-alanina.

#### 15 Ejemplo 3

A continuación se dan ejemplos de composiciones que comprenden D-alanina de acuerdo con la presente invención, a saber, una emulsión, un parche, un comprimido, una cápsula blanda, un gránulo, una bebida, un caramelo, una galleta, una pasta de semillas, un apósito francés, una mayonesa, un pan francés, una salsa de soja, yogur, polvo seco de condimento para arroz, salsa/condimento para natto, natto, vinagre negro no refinado, crema, crema corporal, gel, una máscara exfoliante, un paquete húmedo, una emulsión, un agua cosmética y una preparación de aerosol. Todos estos ejemplos de formulaciones son sólo ilustrativos.

#### Ejemplo de formulación 1 (Preparación de una emulsión)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
	D-alanina	0,42
25	Alcohol behenílico	0,2
	Cetanol	0,5
	Éster de monoácido graso y glicerol	1,8
	Polioxietileno-aceite de ricino hidrogenado	1,0
	Vaselina blanca	2,0
30	Parafina líquida	10,0
	Miristato de isopropilo	3,0
	Metilpolisiloxano (6 cs)	1,5
	Glicerol concentrado	13,0
	Dipropilenglicol	2,0
35	Polímero de carboxivinilo	0,25
	Hialuronato	0,005
	Hidróxido potásico	Cantidad apropiada
	Ácido láctico	Cantidad apropiada
	Etilendiaminotetraacetato sódico	Cantidad apropiada
40	Etilparabeno	Cantidad apropiada
	<u>Agua purificada</u>	<u>Resto</u>
		100,000

## ES 2 544 268 T3

### Ejemplo de formulación 2 (Parche)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
	D-alanina	0,3
	Poli(ácido acrílico)	3,0
5	Poli(acrilato sódico)	2,5
	Gelatina	0,5
	Carboximetilcelulosa sódica	4,0
	Poli(alcohol vinílico)	0,3
	Glicerol concentrado	14,0
10	1,3-Butilenglicol	12,0
	Hidróxido de aluminio	0,1
	Etiendiaminotetraacetato sódico	0,03
	Metilparabeno	0,1
	<u>Agua purificada</u>	<u>Resto</u>
15		100,000

### Ejemplo de formulación 3 (Comprimido)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (mg/comprimido)</u>
	D-Alanina	360,5
20	Lactosa	102,4
	Carboximetilcelulosa cálcica	29,9
	Hidroxipropilcelulosa	6,8
25	Estearato magnésico	5,2
	<u>Celulosa cristalina</u>	<u>10,2</u>
30		515,0

### Ejemplo de formulación 4 (Comprimido)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (mg/comprimido)</u>
	Éster de sacarosa	70
	Celulosa cristalina	74
35	Metilcelulosa	36
	Glicerol	25
	D-Alanina	475
	N-Acetilglucosamina	200
	Ácido hialurónico	150
40	Vitamina E	30
	Vitamina B <sub>6</sub>	20
	Vitamina B <sub>2</sub>	10

## ES 2 544 268 T3

Ácido $\alpha$ -lipoico	20
Coenzima Q10	40
Ceramida (extracto de Konjac)	50
<u>L-Prolina</u>	<u>300</u>

5 1.500

Ejemplo de formulación 5 (Cápsula blanda)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (mg/cápsula)</u>
	Aceite de soja comestible	530
10	Extracto de Eucommia ulmoides	50
	Extracto de Ginseng	50
15	D-Alanina	100
	Jalea real	50
	Maca	30
20	GABA	30
	Cera de abeja	60
25	Gelatina	375
	Glicerol	120
	<u>Éster de ácido graso y glicerol</u>	<u>105</u>

30 1.500

Ejemplo de formulación 6 (Cápsula blanda)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (mg/cápsula)</u>
35	Aceite de semilla de arroz pardo	659
	D-Alanina	500
	Resveratrol	1
40	Extracto de semilla de Lotus	100
	Elastina	180
45	DNA	30
	<u>Ácido fólico</u>	<u>30</u>

1.500

Ejemplo de formulación 7 (Gránulo)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (mg/gránulo)</u>
50	D-Alanina	400
	Vitamina C	100
55	Isoflavona de semilla de soja	250

## ES 2 544 268 T3

	Lactosa reducida	300
	Oligosacárido de semilla de soja	36
5	Eritritol	36
	Dextrina	30
	Agente saboreante	24
10	<u>Ácido cítrico</u>	<u>24</u>
		1.200

### Ejemplo de formulación 8 (Bebida)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g/60 ml)</u>
	Extracto de Euconnia ulmoides	1,6
	Extracto de Ginseng	1,6
	D-Alanina	1,6
20	Jarabe de maltosa reducida	28
	Eritritol	8
	Ácido cítrico	2
	Agente saboreante	1,3
	N-Acetilglucosamina	1
25	Hialuronato sódico	0,5
	Vitamina E	0,3
	Vitamina B <sub>6</sub>	0,2
	Vitamina B <sub>2</sub>	0,1
	Ácido α-lipoico	0,2
30	Coenzima Q10	1,2
	Ceramida (extracto de Konjac)	0,4
	L-Prolina	2
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		60

### 35 Ejemplo de formulación 9 (Caramelo)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
	Azúcar	50
	Jarabe	48
	D-Alanina	1
40	<u>Agente saboreante</u>	<u>1</u>
		100

Ejemplo de formulación 10 (Galleta)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
	Harina de trigo	45,0
	Mantequilla	17,5
5	Azúcar granulado	20,0
	D-Alanina	4,0
	Huevo	12,5
	<u>Agente saboreante</u>	<u>1,0</u>
		100,0

10 Método para producir la formulación del ejemplo 10 (Galleta)

Se añade lentamente, agitando, azúcar granulado, una mantequilla a la que se había añadido previamente, agitando, un huevo, un agente saboreante y D-alanina. Después de mezclar intensamente, se añade, agitando a velocidad lenta, harina blanda tamizada uniformemente, y toda la masa se deja en reposo en un refrigerador. Después, se moldea y hornea durante 15 minutos a 170°C, obteniéndose una galleta.

15 Ejemplo de formulación 11 (Pasta de semillas)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g)</u>
	Aceite de soja	1.000
	Arroz malteado	1.000
	Sal	420
20	D-Alanina	150
	<u>Agua</u>	<u>resto</u>
		4.000

Método para producir el ejemplo de la formulación 11 (Pasta de semillas)

25 Se mezcla intensamente arroz malteado con sal. Se empapa durante una noche semillas lavadas de soja con tres veces su volumen de agua, que después se elimina, se añade agua nueva hirviendo y se vierte en un colador recogiendo el caldo (fluido tanemizu) en el que se disuelve D-alanina a una concentración de 10% (peso/volumen). La masa hervida se pica inmediatamente, se combina con el arroz malteado mezclado con sal al que ha añadido el fluido tanemizu que contiene D-alanina disuelta y se amasa uniformemente obteniéndose un producto de dureza similar a la arcilla. Se hierva la masa, se vierte compactamente en un recipiente sin formar huecos y la superficie del contenido se alisa y se tapa herméticamente con una película de plástico. Después de tres meses, se transfiere el contenido a un nuevo recipiente y la superficie se alisa y se tapa herméticamente con una película de plástico. En lugar de añadir D-alanina al fluido tanemizu, se puede emplear arroz malteado que produce una gran cantidad de D-alanina. Este arroz malteado se puede seleccionar cuantificando D-alanina por el método descrito en la publicación no examinada de patente japonesa número 2008-185558. Alternativamente, se puede suplementar una pasta de semillas disponible comercialmente con D-alanina o con una sal de ésta.

30

35

Ejemplo de formulación 12 (Aliño francés)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g)</u>
	Aceite de ensalada	27,0
	Vinagre	30,0
40	Cloruro sódico	0,9
	D-Alanina	1,1
	<u>Pimienta</u>	<u>1,0</u>
		160,0

## ES 2 544 268 T3

Método para producir el ejemplo de formulación 12 (Aliño francés)

Se combina vinagre con cloruro sódico y D-alanina y se agita intensamente hasta obtener una solución. Se añade aceite de ensalada a la mezcla, se agita intensamente y después se añade pimienta.

Ejemplo de formulación 13 (Mayonesa)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g)</u>
5	Aceite de ensalada	134,0
	Vinagre	5
	Cloruro sódico	0,9
	D-Alanina	1
10	Yema de huevo	18
	Azúcar	0,2
	<u>Pimienta</u>	<u>0,9</u>
		160,0

Método para producir el ejemplo de formulación 13 (Mayonesa)

15 Se añade vinagre, cloruro sódico, pimienta y D-alanina a yema de huevo (a temperatura ambiente) y se agita intensamente usando una batidora. Se continúa agitando mientras se añade en porciones aceite de ensalada para formar una emulsión. Finalmente, se añade azúcar y se agita la mezcla.

Ejemplo de formulación 14 (Pan francés)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g)</u>
20	Harina compacta	140
	Harina blanda	60
	Cloruro sódico	3
	Azúcar	6
	D-Alanina	2
25	Levadura seca	4
	<u>Agua templada</u>	<u>128</u>
		343

Método para producir el ejemplo de formulación 14 (Pan francés)

30 Se combina agua templada con 1 g de azúcar y levadura seca y después se deja que se produzca una prefermentación. Se añade en un pote, al que se había añadido previamente la levadura prefermentada, harina compacta, harina blanda, cloruro sódico, 5 g de azúcar y D-alanina. Después de amasar intensamente, se realiza una fermentación primaria a 30°C. El conjunto se amasa de nuevo y se deja en reposo y después se conforma en formas adecuadas que se someten a una fermentación final usando una máquina de fermentación electrónica. Después de formar panes, se realiza una cocción durante 30 minutos en un horno a 220°C.

35 Ejemplo de formulación 15 (Salsa de soja)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g)</u>
	Salsa de soja disponible comercialmente	900
	<u>D-alanina</u>	<u>100</u>
		1.000

40

Método para producir el ejemplo de formulación 15 (Salsa de soja)

Se añade salsa de soja disponible comercialmente a D-alanina o a una sal de ésta y se agita intensamente. En lugar de añadir D-alanina o una sal de ésta, para fermentar la salsa de soja se puede añadir arroz malteado. Este arroz malteado se puede seleccionar cuantificando D-alanina por el método descrito en la publicación no examinada de patente japonesa número 2008-1185558.

5

Ejemplo de formulación 16 (Yogur)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g)</u>
	Leche	880
	L. bulgaricus	50
10	S. thermophilus	50
	<u>D-Alanina</u>	<u>20</u>
		1.000

Método para producir el ejemplo de formulación 16 (Yogur)

Se realiza la fermentación a una temperatura de 40 a 45°C. Se pueden emplear otros organismos de fermentación disponibles comercialmente y se puede suplementar el yogur con D-alanina o con una sal de ésta. En lugar de añadir D-alanina o una sal de ésta, se puede emplear un organismo que produzca una gran cantidad de D-alanina. Este organismo se puede seleccionar cuantificando D-alanina por el método descrito en la publicación no examinada de patente japonesa número 2008-185558.

15

Ejemplo de formulación 17 (Polvo seco de aliño para arroz)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g)</u>
	D-Alanina	50
	Agua de lavado	15
	L-glutamato sódico	10
	Cloruro sódico	2
25	Sésamo tostado	10
	Trozos secos de caballa	10
	Azúcar	1
	<u>Salsa de soja</u>	<u>2</u>
		100

30 Ejemplo de formulación 18 (Salsa/aliño para natto)

<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g)</u>
Salsa disponible comercialmente para natto	9
<u>D-Alanina</u>	<u>1</u>
	10

35 Ejemplo de formulación 19 (Natto)

<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g)</u>
Salsa disponible comercialmente de natto	19,9
<u>D-Alanina</u>	<u>0,1</u>
	20,0

40

Método para producir el ejemplo de formulación 19 (Natto)

Se añade D-alanina o una sal de ésta a natto disponible comercialmente y se mezcla intensamente. En lugar de añadir D-alanina o una sal de ésta, para producir natto se puede añadir un microorganismo que produzca una gran cantidad de natto. Este organismo se puede seleccionar cuantificando D-alanina por el método descrito en la publicación no examinada de patente japonesa número 2008-185558.

5

Ejemplo de formulación 20 (Vinagre negro no refinado)

<u>Componentes</u>	<u>Contenido (g)</u>
Vinagre negro no refinado disponible comercialmente	900
<u>D-alanina</u>	<u>100</u>

10

1.000

Método para producir el ejemplo de formulación 20 (Vinagre negro no refinado)

Se añade D-alanina o una sal de ésta a vinagre negro no refinado disponible comercialmente y se agita intensamente. En lugar de añadir D-alanina o una sal de ésta, para producir vinagre, vinagre negro o vinagre negro no refinado se puede emplear un microorganismo que produzca una gran cantidad de D-alanina. Este organismo se puede seleccionar cuantificando D-alanina por el método descrito en la publicación no examinada de patente japonesa número 2008-185558.

15

Ejemplo de formulación 21 (Crema)

<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
Parafina líquida	3
Vaselina blanca	1
Dimetilsiloxano	1
Alcohol estearílico	1,8
Alcohol behenílico	1,6
Glicerol	8
Dipropilenglicol	5
Aceite de nuez <i>Macadamia</i>	2
Aceite hidrogenado	3
Escualano	6
Ácido esteárico	2
Hidroxiestearato de colesteroilo	0,5
2-Etilhexanoato de cetilo	4
Polioxietileno-aceite de ricino hidrogenado	0,5
Monoestearato de glicerilo autoemulsionante	3
Hidróxido potásico	0,15
Hexametáfosfato sódico	0,05
Trimetilglicina	2
Ascorbilitofoferil fosfato potásico	1
Acetato de tocoferilo	0,1
D-Alanina	4
Parabeno	Cantidad apropiada

20

25

30

35

40

ES 2 544 268 T3

	Etilendiaminotetraacetato trisódico	0,05
	4-terc-Butil-4'-metoxidibenzoilmetano	0,05
	Dimetoxicinamato de etilhexanoato de glicerilo	0,05
	Colorante	Cantidad apropiada
5	Polímero de carboxivinilo	0,05
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		100,00

Ejemplo de formulación 22 (crema corporal)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
10	Dimetilpolisiloxano	3
	Decametilciclopentasiloxano	13
	Dodecametilciclohexasiloxano	12
	Copolímero de polioxietileno-metilsiloxano	1
	Etanol	2
15	Isopropanol	1
	Glicerol	3
	Dipropilenglicol	5
	Polietilenglicol 6.000	5
	Hexametafosfato sódico	0,05
20	Acetato de tocoferilo	0,1
	D-Alanina	5
	Extracto de <i>Foeniculum vulgare</i> (hinojo)	0,1
	Extracto de <i>Hamamelis virginiana</i> (avellano virginiano)	0,1
	Extracto de Ginseng	0,1
25	L-Mentol	cantidad apropiada
	Éster del ácido paraoxibenzoico	cantidad apropiada
	Etilendiaminotetraacetato trisódico	0,05
	Dimorfolinopiridazinonaisopentilo	0,01
	Trimetoxicinamato Trisiloxano	0,1
30	Óxido de hierro amarillo	cantidad apropiada
	Titanato de cobalto	cantidad apropiada
	Hectorita de dimetildiesterilamonio	1,5
	Poli(alcohol vinílico)	0,1
	Hidroxietilcelulosa	0,1
35	Silicato de trimetilsiloxilo	2
	Agente saboreante	cantidad apropiada
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		100,00

## ES 2 544 268 T3

### Ejemplo de formulación 23 (Gel)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
	Dimetilpolisiloxano	5
	Glicerol	2
5	1,3-Butilenglicol	5
	Polietilenglicol 1.500	3
	Polietilenglicol 20.000	3
	Etilhexanoato de cetilo	3
	Ácido cítrico	0,01
10	Citrato sódico	0,1
	Hexametáfosfato sódico	0,1
	Glicirricinato dipotásico	0,1
	D-Alanina	2
	Acetato de tocoferol	0,1
15	Extracto de raíz de <i>Scutellaria baicalensis</i>	0,1
	Extracto de <i>Saxifraga sarmentosa</i>	0,1
	Etilendiaminotetraacetato trisódico	0,1
	Goma de xantano	0,3
	Polímero entrecruzado de acrilatos/acrilato de alquilo C <sub>10-30</sub> (Pemulen TR-2)	0,05
20	Polvo de agar	1,5
	Fenoxietanol	cantidad apropiada
	Dibutilhidroxitolueno	cantidad apropiada
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		100,00

### 25 Ejemplo de formulación 24 (Máscara exfoliadora)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
	Etanol	10
	1,3-Butilenglicol	6
	Polietilenglicol 4.000	2
30	Aceite de oliva	1
	Aceite de nuez de <i>Macadamia</i>	1
	Hidroxiestearato de fitoestearilo	0,05
	Ácido láctico	0,05
	Lactato sódico	0,1
35	Ascorbilsulfato disódico	0,1
	Ascorbiltocoferilfosfato potásico	0,1
	D-Alanina	10

## ES 2 544 268 T3

	Colágeno de pescado	0,1
	Condroitinsulfato sódico	0,1
	Carboximetilcelulosa sódica	0,2
	Poli(alcohol vinílico)	12
5	Éster del ácido paraoxibenzoico	cantidad apropiada
	Agente saboreante	cantidad apropiada
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		100,00

### Ejemplo de formulación 25 (Paquete húmedo)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
10	Glicerol	1
	1,3-Butilenglicol	8
	Xilitol	2
	Polietilenglicol 1.500	2
15	Aceite de romero	0,01
	Aceite de salvia	0,1
	Ácido cítrico	0,02
	Citrato sódico	0,08
	Hexametáfosfato sódico	0,01
20	Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina	0,1
	D-Alanina	0,5
	Extracto de abedul	0,1
	Aceite de lavanda	0,01
	Goma de xantano	0,05
25	Polímero de carboxivinilo	0,15
	Éster del ácido paraoxibenzoico (Parabeno)	cantidad apropiada
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		100,00

### Ejemplo de formulación 26 (Emulsión)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
30	Parafina líquida	7
	Vaselina blanca	3
	Decametilciclopentasiloxano	2
	Alcohol behenílico	1,5
35	Glicerol	5
	Dipropilenglicol	7
	Polietilenglicol 1.500	2

## ES 2 544 268 T3

	Aceite de jojoba	1
	Ácido isoesteárico	0,5
	Ácido esteárico	0,5
	Ácido behénico	0,5
5	Tetraacetato de pentaeritritol	3
	2-Etilhexanoato de cetilo	3
	Monoestearato de glicerilo	1
	Polioxietileno-monoestearato de glicerilo	1
	Hidróxido potásico	0,1
10	Hexametáfosfato sódico	0,05
	Glicirretinato de estearilo	0,05
	D-Alanina	1
	Extracto de jalea real	0,1
	Extracto de levadura	0,1
15	Acetato de tocoferilo	0,1
	Hialuronato sódico acetilado	0,1
	Etilendiaminotetraacetato trisódico	0,05
	4-terc-Butil-4'-metoxidibenzoilmetano	0,1
	Parametoxicinamato de 2-etilhexilo	0,1
20	Polímero de carboxivinilo	0,15
	Parabeno	cantidad apropiada
	Agente saboreante	cantidad apropiada
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		100,00

25	Ejemplo de formulación 27 (Emulsión)	
	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
	Dimetilpolisiloxano	2
	Alcohol behenílico	1
30	Alcohol batílico	0,5
	Glicerol	5
	1,3-Butilenglicol	7
	Eritritol	2
	Aceite hidrogenado	3
35	Escualano	6
	Tetraacetato de pentaeritritol	3
	2-Etilhexanoato de cetilo	3

ES 2 544 268 T3

	Isoestearato de polioxietilenglicerilo	1
	Monoestearato de polioxietilenglicerilo	1
	D-Alanina	0,3
	Hidróxido potásico	cantidad apropiada
5	Hexametafosfato sódico	0,05
	Fenoxietanol	cantidad apropiada
	Polímero de carboxivinilo	0,1
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		100,00

10 Ejemplo de formulación 28 (Loción para la piel)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
	Alcohol etílico	5
	Glicerol	1
	1,3-Butilenglicol	5
15	Polioxietileno-polioxipropilendecilo Éter tetradecílico	0,2
	Hexametafosfato sódico	0,03
	Trimetilglicina	1
	Poliasparaginato sódico	0,1
	Ascorbilitofoerilfosfato potásico	0,1
20	Tiotaurina	0,1
	D-Alanina	8
	Etlendiaminotetraacetato trisódico	0,1
	Polímero de carboxivinilo	0,05
	Hidróxido potásico	0,02
25	Fenoxietanol	cantidad apropiada
	Agente saboreante	cantidad apropiada
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		100,00

Ejemplo de formulación 29 (loción para la piel)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
30	Alcohol etílico	10
	Dipropilenglicol	1
	Polietilenglicol 1.000	1
	Polioxietileno-metilglucósido	1
35	Aceite de jojoba	0,01
	Tri(2-etilhexanoato) de glicerilo	0,1
	Polioxietileno-aceite de ricino hidrogenado	0,2

## ES 2 544 268 T3

	Diisoestearato de poliglicerilo	0,15
	N-Estearoil-L-glutamato sódico	0,1
	Ácido cítrico	0,05
	Citrato sódico	0,2
5	Hidróxido potásico	0,4
	Glicirricinato dipotásico	0,1
	Hidrocloruro de arginina	0,1
	2-Glucósido del ácido L-ascórbico	2
	D-Alanina	0,5
10	Etilendiaminotetraacetato trisódico	0,05
	4-Metoxicinamato de octilo	0,01
	Dibutilhidroxitolueno	cantidad apropiada
	Parabeno	cantidad apropiada
	Agua de alta mar	3
15	Agente saboreante	cantidad apropiada
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		100,00

Ejemplo de formulación 30 (Preparación de una solución de aerosol de urea para uso externo)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
20	Alcohol etílico	15,0
	Polioxietileno-aceite de ricino hidrogenado	1,5
	Difenilhidramina	1,0
	Dibucaína	2,0
	Acetato de tocoferol	0,5
25	D-Alanina	0,1
	Ácido isoesteárico	0,1
	1,3-Butilenglicol	3,0
	Polietilenglicol 400	3,0
	Alcanfor	0,05
30	Urea	20,0
	<u>Agua purificada</u>	<u>resto</u>
		100,00

Ejemplo de formulación 31 (espray de aerosol de urea)

	<u>Componentes</u>	<u>Contenido (% en peso)</u>
35	Solución principal de aerosol de urea	65,0
	<u>Dimetil éter</u>	<u>35,0</u>
		100,00

## ES 2 544 268 T3

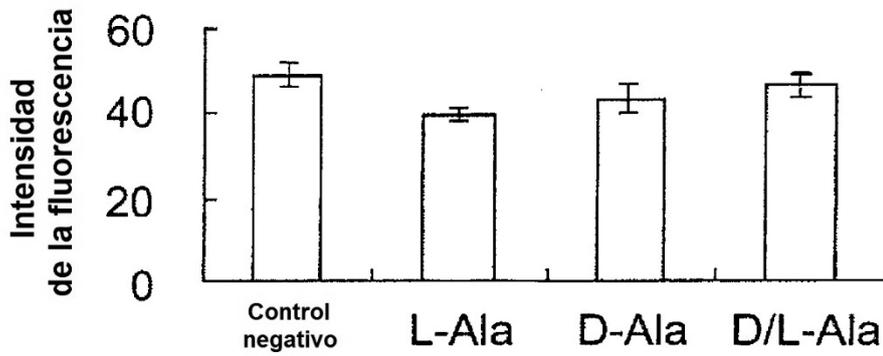
Método de rellenar el ejemplo de formulación 31 (espray de aerosol de urea)

Se carga la solución principal de aerosol de urea para uso externo en un bote de aluminio para aerosol, resistente a la presión, cuya superficie interior ha sido recubierta con Teflón, para preparar la preparación del aerosol.

**REIVINDICACIONES**

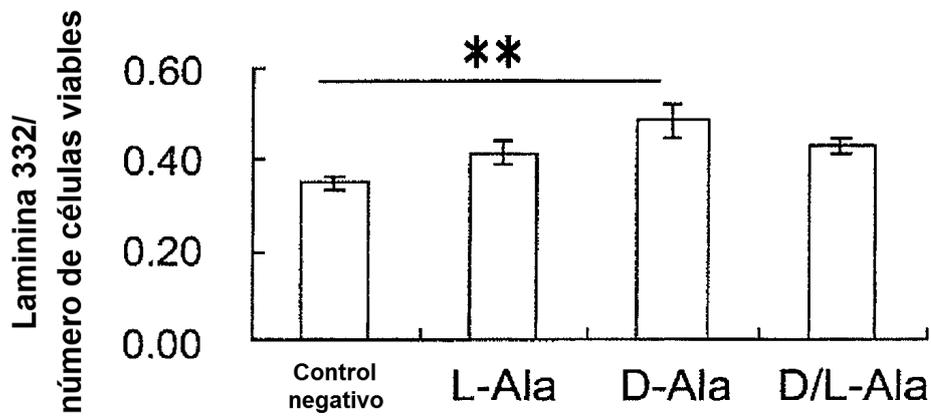
- 5 1. Una composición para uso para eliminar y/o mejorar el estado de la piel por estimular la producción de laminina 332, comprendiendo la composición uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en D-alanina, un derivado de ésta o una sal de ésta, en la que el derivado de D-alanina está unido covalentemente a cualquier grupo atómico mediante su grupo amino, grupo carboxi o cadena lateral, con la condición de que no se deteriore el efecto estimulante de la D-alanina sobre la producción de laminina 332.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la el estado de la piel se selecciona del grupo que consiste en fotoenvejecimiento, arrugas, piel rugosa, arrugas finas y piel seca.
3. La composición de acuerdo con las reivindicación 1 ó 2, para uso como producto farmacéutico.
- 10 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para uso como preparación externa para la piel.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para uso como alimento.
- 15 6. Uso de una composición en la fabricación de un producto para eliminar y/o mejorar el estado de la piel por estimular la producción de laminina 332, comprendiendo la composición uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en D-alanina, un derivado de ésta y una sal de ésta, en la que el derivado de D-alanina es una molécula en la que la D-alanina está unida covalentemente por cualquier grupo atómico mediante su grupo amino, grupo carboxi o cadena lateral, con la condición de que no se deteriore el efecto estimulante de la D-alanina sobre la producción de laminina 332.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el estado de la piel se selecciona del grupo que consiste en fotoenvejecimiento, arrugas, piel rugosa, arrugas finas y piel seca.

20



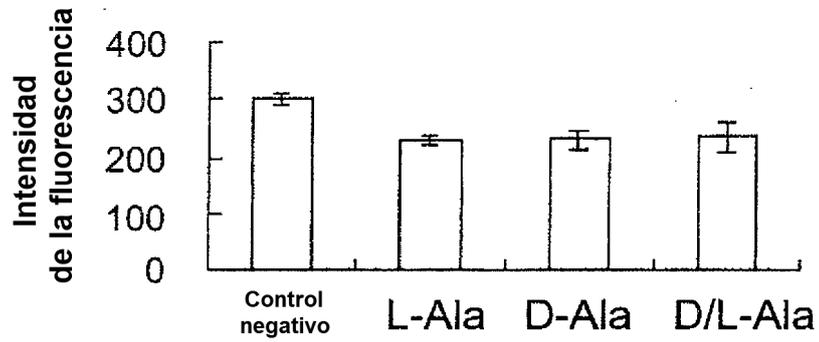
(Ensayo de Tukey-Kramer)

FIG.1



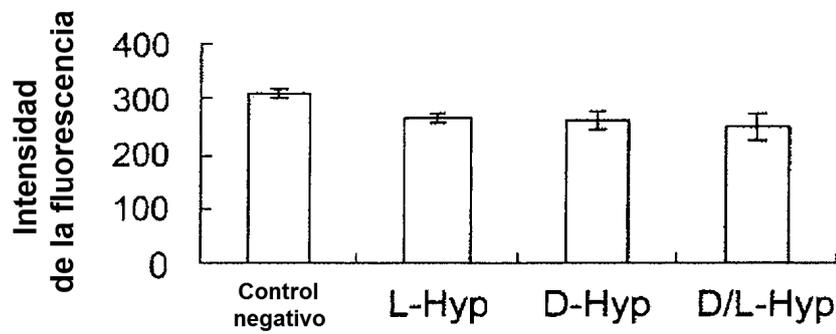
(\*\* :  $p < 0,01$  \* :  $p < 0,05$  ensayo F de Scheffe)

FIG.2



(Ensayo de Tukey-Kramer)

FIG.3



(Ensayo de Tukey-Kramer)

FIG.4

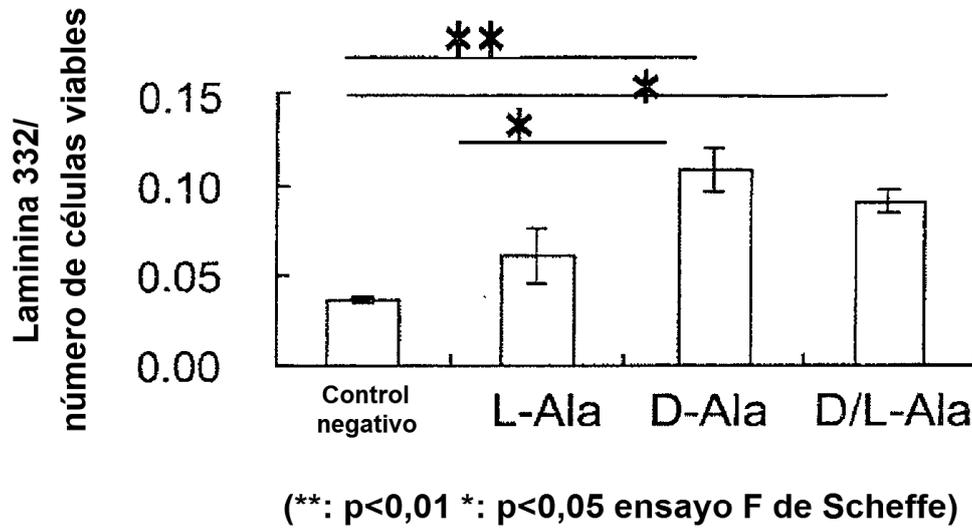


FIG.5

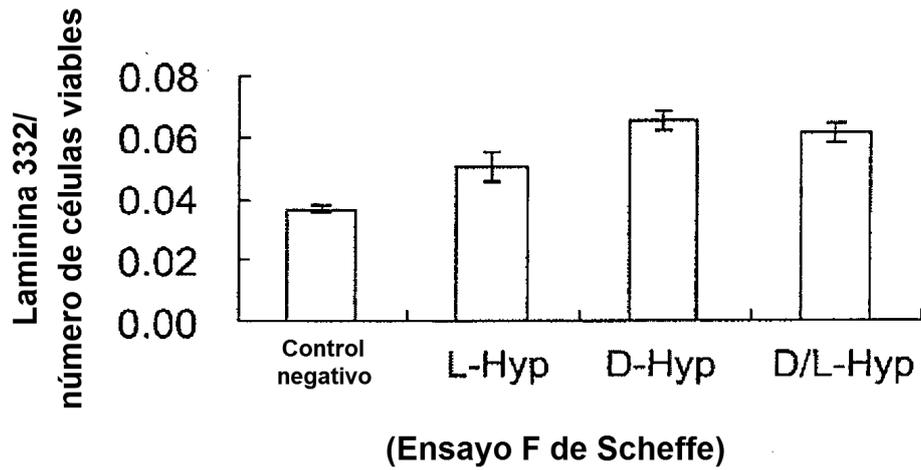


FIG.6

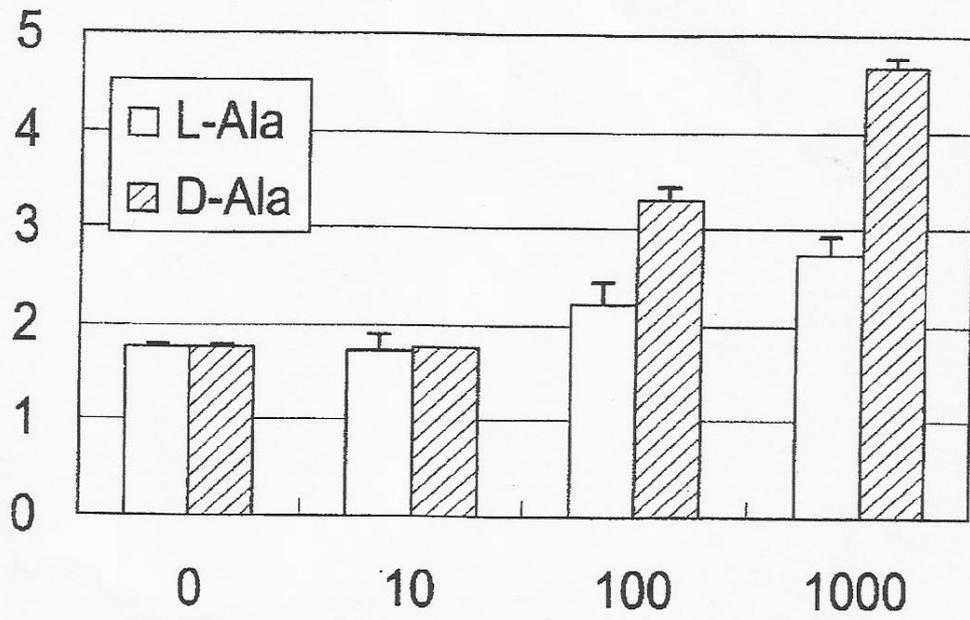


FIG.7

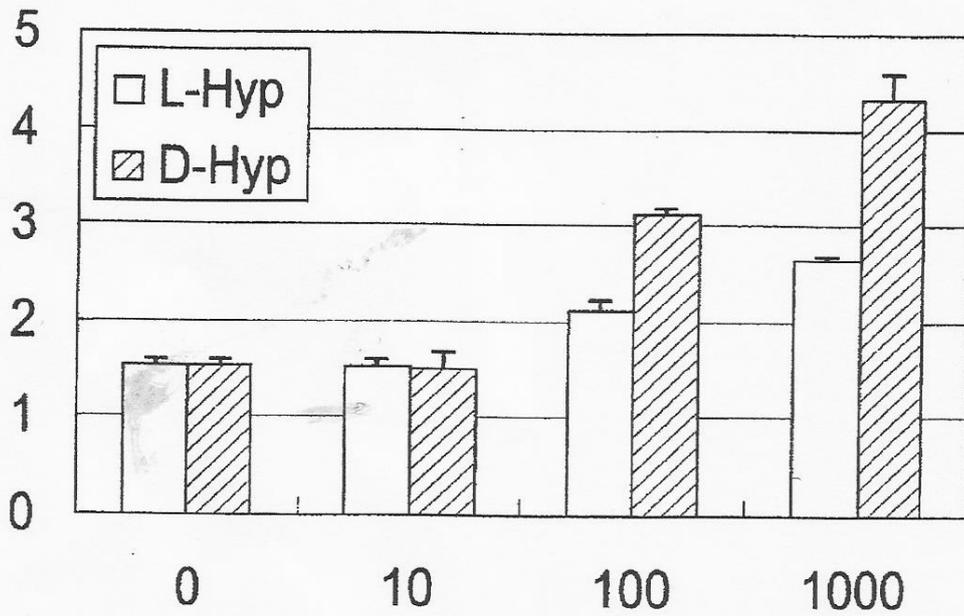


FIG.8

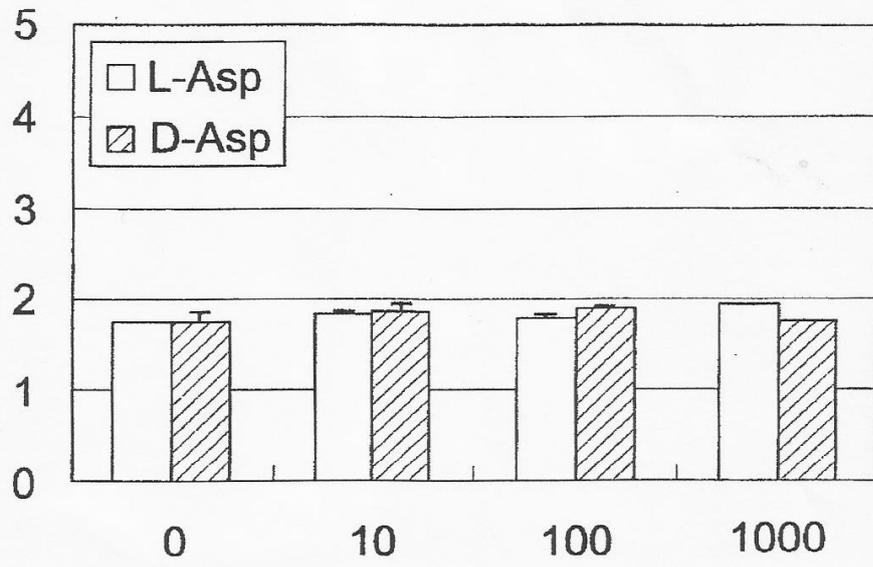


FIG.9

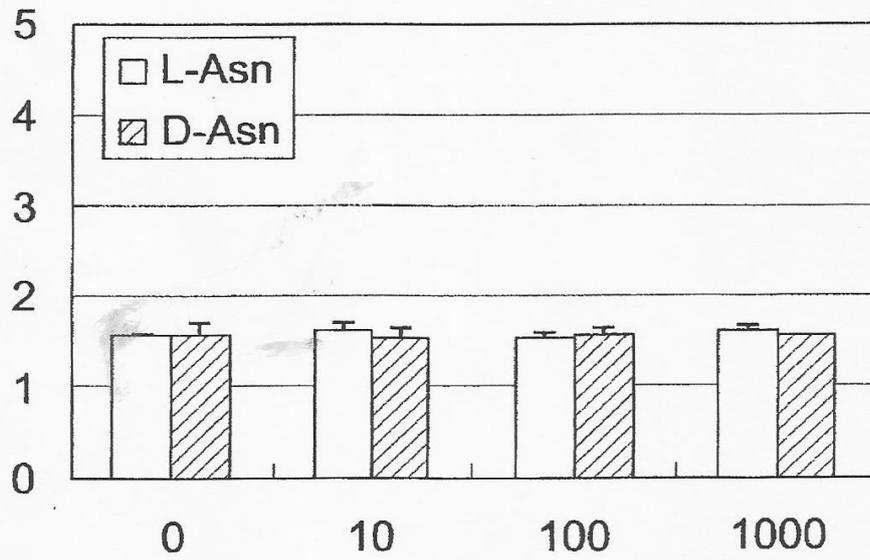


FIG.10

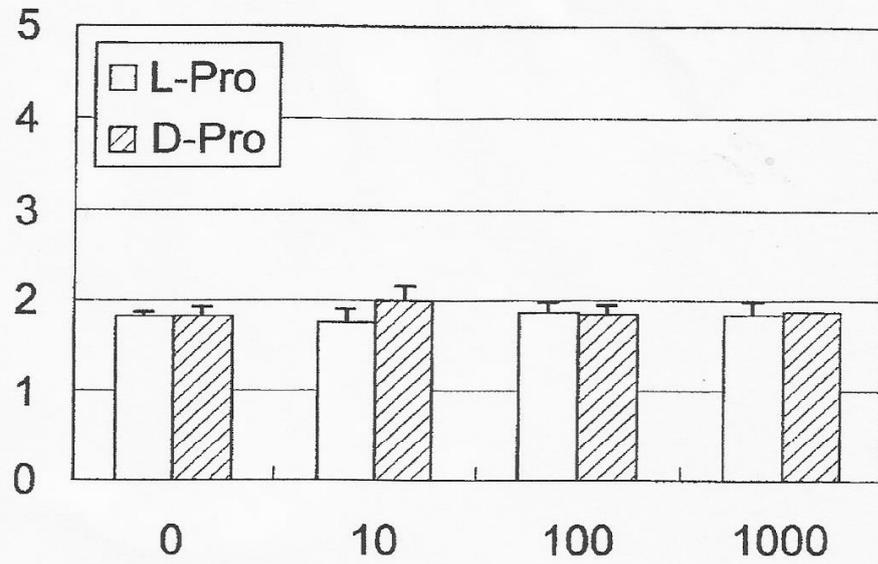


FIG.11

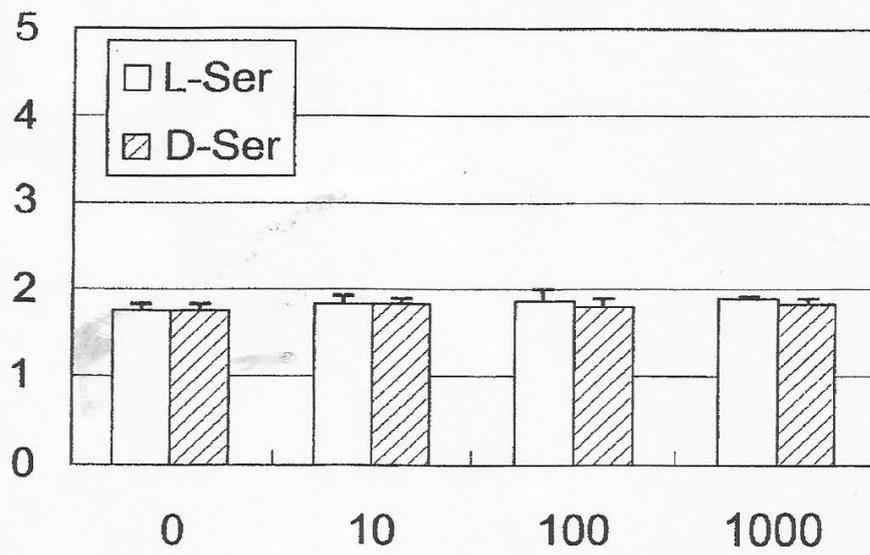


FIG.12