

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 537**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 8/44</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/197</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)
<b>A23C 9/13</b>	(2006.01)
<b>A23L 2/52</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2010 PCT/JP2010/066672**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11040363**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2010 E 10820478 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2484340**

54 Título: **Composición para acelerar la producción de colágeno**

30 Prioridad:

**29.09.2009 JP 2009224743**  
**30.09.2009 JP 2009225870**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.11.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ASHIDA, YUTAKA;**  
**TOJO, YOSUKE;**  
**SHIMADA, SHOICHIRO;**  
**MIZUMOTO, CHIEKO y**  
**MITA, MASASHI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 733 537 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 para acelerar la producción de colágeno

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere al uso cosmético, no terapéutico, de uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido D-aspártico y/o sales del mismo para suprimir y/o atenuar las arrugas de la piel mediante estimulación de la producción de colágeno, así como a un método cosmético para suprimir y/o atenuar las arrugas de la piel mediante la administración de dicho uno o más compuestos a un sujeto. La invención se refiere, además, al uso terapéutico de uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido D-aspártico y/o sales del mismo para suprimir y/o atenuar una afección de la piel provocada por el fotoenvejecimiento.

**10 Antecedentes**

15 El colágeno de tipo I es una de las principales proteínas de la piel y es una proteína de triple hélice compuesta por dos hebras de una cadena  $\alpha$  (alfa) 1 (I) y una hebra de una cadena  $\alpha$ (alfa) 2 (I). El colágeno de tipo I es producido por los fibroblastos en la epidermis y forma una matriz extracelular en la que están incrustados los fibroblastos. Tanto el envejecimiento intrínseco como el fotoenvejecimiento están acompañados de una producción reducida de colágeno y una mayor actividad de la colagenasa (Documentos no de patente 1 a 3). Por lo tanto, se ha creído que una promoción en la producción de colágeno conduce a la supresión y/o atenuación de una afección de la piel causada por el envejecimiento intrínseco o el fotoenvejecimiento, por ejemplo, la formación de arrugas. De hecho, se sabe que los retinoides, es decir, los derivados de vitamina A, son eficaces cuando se los aplica en el rostro o en la piel de la parte superior del brazo causada por el envejecimiento intrínseco o el fotoenvejecimiento (Documentos no de patente 4 y 20 5). Sin embargo, los retinoides tienen un efecto secundario, tal como la fotosensibilización o la reacción inflamatoria conocida como reacción a los retinoides (Documento no de patente 6). Además, con una fotorreactividad generalmente alta, se debe proteger a los retinoides de la luz para un almacenamiento estable. Así, después de la administración a la piel, los retinoides pueden descomponerse fácilmente por la luz que penetra en un cuerpo vivo en condiciones de vida normales.

25 El Documento de patente 1 describe una composición para atenuar las arrugas y para promover la producción de colágeno, comprendiendo la composición productos de reacción de Maillard generados a partir de una preparación de ginseng rojo. Los productos de la reacción de Maillard comprenden, entre otros, un polímero de melanoidina con un peso molecular inferior a 4.800, maltulosil arginina con un peso molecular inferior a 4.000, fructosil arginina con un peso molecular inferior a 2.000 y diferentes aminoácidos, incluidos el ácido aspártico y la alanina.

30 El Documento de patente 2 describe una composición para el tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero que presenta un aumento indeseable en los niveles de especies reactivas de oxígeno u otros radicales libres en células o tejidos mediante la regulación por incremento de la expresión de SOD y/o CAT, comprendiendo la composición un compuesto, basado en un solo aminoácido, de la fórmula  $R^1\text{-Xaa-R}^2$  en la que Xaa puede representar ácido D-aspártico. En una realización, la enfermedad o afección está relacionada con el proceso de envejecimiento 35 (senescencia).

**Documentos de la técnica anterior**

Documentos no de patentes

Documento no de patente 1: Takeda, K. et al., J. Cell. Physiol., 153:450 (1992)

Documento no de patente 2: Varani, J. et al., Am. J. Pathol., 158:931 (2001)

40 Documento no de patente 3: Varani, J. et al., Am. J. Pathol., 168:1861 (2006)

Documento no de patente 4: Kligman, A. M. et al., J. Am. Acad. Dermatol., 15:836 (1986)

Documento no de patente 5: Kligman, A.M. et al., J. Am. Acad. Dermatol., 29:25 (1993)

Documento no de patente 6: Mukherjee, S. et al., Clin. Interv. Aging 1:327 (2006)

Documentos de patente

45 Documento de patente 1: KR 2007-0109013 A

Documento de patente 2: US 2005/0130881 A1

**Descripción de la invención**

Problema planteado

Bajo estas circunstancias, existe la necesidad de desarrollar una composición novedosa que ejerza un efecto sobre la

promoción de la producción de colágeno, específicamente una composición que tenga una alta fotoestabilidad y esté libre de efectos secundarios como los de los retinoides.

Medios para solucionar el problema

5 La presente invención se define por las reivindicaciones y, en un aspecto, se refiere al uso cosmético, no terapéutico, de uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido D-aspártico y/o sales del mismo para suprimir y/o atenuar las arrugas de la piel mediante estimulación de la producción de colágeno.

Se puede proporcionar uno o más compuestos en forma de una preparación de uso externo para la piel.

Se puede proporcionar uno o más compuestos en forma de alimento.

10 Se puede proporcionar uno o más compuestos en forma de una composición para promover la producción de colágeno de tipo I.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método cosmético para suprimir y/o atenuar las arrugas de la piel mediante estimulación de la producción de colágeno, comprendiendo el método una etapa para administrar uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido D-aspártico y/o sales del mismo a un sujeto.

15 Con respecto al método de la presente invención, se puede administrar uno o más compuestos en forma de una preparación de uso externo para la piel.

Con respecto al método de la presente invención, se puede administrar uno o más compuestos en forma de alimento.

De acuerdo con el método de la presente invención, se puede administrar uno o más compuestos en forma de una composición para promover la producción de colágeno de tipo I.

20 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido D-aspártico y/o sales del mismo para su uso con el fin de suprimir y/o atenuar una afección de la piel causada por el fotoenvejecimiento mediante estimulación de la producción de colágeno.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido D-aspártico y/o sales del mismo para preparar un cosmético para atenuar las arrugas de la piel mediante estimulación de la producción de colágeno.

25 Como se usa en la presente memoria, el término "sal" del ácido D-aspártico indica cualquier sal que comprenda una sal metálica y una sal de amina o similar, siempre que el efecto sobre la promoción de la producción de colágeno de ácido D-aspártico no se vea afectado. Las sales metálicas pueden comprender una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo y similares. Las sales de amina pueden comprender una sal de trietilamina, una sal de bencilamina y similares.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "derivados" del ácido D-aspártico indica moléculas de ácido D-aspártico que se unen covalentemente a cualquier grupo atómico a través de sus grupos amino, grupos carboxilo o cadenas laterales, siempre que el efecto sobre la promoción de la producción de colágeno del ácido D-aspártico no se vea afectado. El grupo atómico incluye, pero no se limita a grupos protectores, tales como el grupo N-fenilacetilo y el grupo 4,4'-dimetoxitriilo (DMT); biopolímeros, tales como una proteína, un péptido, un sacárido, un lípido y un ácido nucleico; polímeros sintéticos, tales como un poliestireno, un polietileno, un polivinilo y un poliéster; y grupos funcionales tales como un grupo éster. El grupo éster puede comprender, por ejemplo, un éster alifático, tal como éster metílico y éster etílico; y un éster aromático.

40 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 solo se emplean L-aminoácidos excluyendo algunas excepciones, tales como una pared celular bacteriana. Por lo tanto, se ha considerado que en un mamífero que incluye un ser humano, solo están presentes L-aminoácidos y solo se usan L-aminoácidos (Kinouchi, T. et al., TANPAKUSHITSU KAKUSAN KOSO (PROTEN, NUCLEIC ACID AND ENZYME), 50:453-460 (2005), Lehninger Principles of Biochemistry [Vol. 1] 2.º ed., pág. 132-147 (1993), traducción al japonés, Hirokawa Shoten Ltd., Harped's Biochemistry, Versión original, 22.º ed., pág. 21-30 (1991), traducción al japonés de Maruzen Co., Ltd.). Por consiguiente, solo los L-aminoácidos se han empleado principalmente como aminoácidos en forma académica e industrial durante mucho tiempo.

45 Los casos excepcionales en los que se emplea un D-aminoácido son, por ejemplo, un caso de uso como materia prima para un antibiótico producido por un microorganismo, y un caso de un aditivo alimentario que emplea un D-aminoácido en una mezcla de DL-amino con el fin de reducir el costo de fraccionar solo un L-aminoácido a partir de una mezcla de los L y D-aminoácidos, que se obtienen en cantidades equimolares sintetizando los aminoácidos. Sin embargo, no ha habido ningún caso de usar solo un D-aminoácido que no incluya un L-aminoácido industrialmente como una sustancia fisiológicamente activa.

50 La D-serina y el ácido D-aspártico tienen una alta proporción de forma D, y por lo tanto, se han realizado muchos estudios en comparación con otros aminoácidos. La D-serina se localiza en el cerebro y el hipocampo, y se conoce

como un factor regulador para el receptor de NMDA en el cerebro. Se descubrió que el ácido D-aspártico se localiza en los testículos y el cuerpo pineal, y se sabe que está involucrado en el control de la secreción de hormonas (publicación de patente japonesa no examinada N.º 2005-3558). Sin embargo, las actividades fisiológicas del ácido D-aspártico y D-alanina en la piel no están claramente definidas.

5 Como se ilustra en los siguientes ejemplos, el efecto en la promoción de la producción de colágeno de ácido D-aspártico se desconoce hasta ahora. Por lo tanto, el uso de ácido D-aspártico como se describe en la presente memoria es una invención novedosa.

10 Recientemente, se informó que se les permitió ingerir libremente a ratones ddY una solución acuosa 10 mM de un D-aminoácido durante dos semanas y luego, se examinó la concentración de D-aminoácido en cada órgano, que fue de 3 a 1.000 pmol por glándula en la glándula pineal y de 2 a 500 nmol por gramo húmedo en el tejido cerebral (Morikawa, A. et al., "Amino Acids", 32: 13-20 (2007)). En base a lo anterior, el límite inferior para la cantidad de ingesta diaria de ácido D-aspártico se calcula como se describe a continuación.

15 El ácido D-aspártico tiene un efecto sobre la promoción de la producción de colágeno en fibroblastos humanos cultivados dentro del intervalo de concentración de 0,01 µM (micromolar) a 320 µM (micromolar), como se describe en los siguientes ejemplos. Por lo tanto, la cantidad de ácido D-aspártico que está contenida en una composición descrita en la presente memoria puede ser cualquier contenido, siempre que el ácido D-aspártico en el intervalo de concentración anterior se administre a fibroblastos en el tejido de la piel *in vivo*. En cuanto a una preparación de uso externo para la piel, el contenido de ácido D-aspártico puede ser de 0,0000001% en peso a 50% en peso, o hasta la concentración máxima en peso que se puede formular en la composición total de la invención. Específicamente, cuando la composición es una preparación de uso externo para la piel, el contenido de ácido D-aspártico es preferiblemente de 0,000001 % en peso a 30 % en peso, y lo más preferiblemente de 0,00001 % en peso a 3 % en peso. Cuando la composición es un agente interno, el contenido de ácido D-aspártico puede estar dentro del intervalo de 0,0000001 % en peso a 100 % en peso. Cuando la composición es un agente interno, el contenido de ácido D-aspártico es preferiblemente de 0,0000002 % en peso a 80 % en peso y lo más preferiblemente de 0,000001 % en peso a 60 % en peso. Además, el límite inferior de una cantidad de ingesta diaria de ácido D-aspártico que está contenida en la composición puede ser de 0,01 ng, preferiblemente de 0,1 ng, y más preferiblemente de 1 ng por kilogramo de peso corporal.

20 La composición descrita en la presente memoria puede comprender, además, uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables, además del grupo de ácido D-aspártico y/o sales de ácido D-aspártico, siempre que el efecto sobre la promoción de la producción de colágeno de ácido D-aspártico no se vea afectado. Dichos aditivos comprenden, pero no se limitan a un diluyente y un prolongador, un aglutinante y un adhesivo, un lubricante, un deslizante, un plastificante, un disgregante, un disolvente portador, un agente tampón, un colorante, un agente saborizante, un edulcorante, un conservante y un estabilizante, un adsorbente, así como otros aditivos farmacéuticos conocidos por los expertos en la técnica.

35 La composición descrita en la presente memoria puede prepararse usando, como componente activo, solo ácido D-aspártico y/o sales de ácido D-aspártico. Sin embargo, dentro del intervalo en el que el efecto de la presente invención no se ve afectado, puede formularse de manera apropiada con otros componentes que se usan para una preparación de uso externo para la piel, tales como cosméticos que comprenden cuasi fármacos y productos farmacéuticos, si es necesario. Ejemplos de otros componentes (es decir, componentes formulados opcionalmente) 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 rayos UV, un agente humectante, un agente saborizante, varios ingredientes farmacéuticamente activos, un conservante, un agente de ajuste del pH y un agente neutralizante.

40 Una forma de dosificación de la composición descrita en la presente memoria (a continuación, en la presente memoria, referida como "agente para mejorar el estado de la piel") puede ser cualquiera que se use comúnmente para composiciones de cuasi fármacos y composiciones farmacéuticas que comprenden una preparación de uso externo para la piel como una pomada, una crema, una emulsión, una loción, una compresa, gel y un parche, una preparación oral como polvo, gránulos, una cápsula blanda y un comprimido, una preparación pernasal como un aerosol nasal, y una solución inyectable.

50 Una forma de dosificación de la preparación de uso externo para la piel no está específicamente limitada, siempre que se use convencionalmente para una preparación de uso externo para la piel, y comprende una pomada, una crema, una emulsión, una loción, una compresa, un gel, y un parche.

55 Asimismo, la composición alimenticia descrita en la presente memoria puede comprender, además de ácido D-aspártico y/o sales de ácido D-aspártico, un condimento, un colorante, un conservante y otros componentes que pueden usarse para un producto alimenticio, siempre que el efecto sobre la promoción de la producción de colágeno por el ácido D-aspártico no se vea afectado.

La composición alimenticia descrita en la presente memoria puede ser cualquiera empleada convencionalmente como una composición alimenticia que comprende, entre otros, una golosina, una galleta, pasta de judías, un aderezo francés, una mayonesa, un pan francés, una salsa de soja, yogur, condimento seco en polvo para arroz,

condimento/salsa para natto (soja fermentada japonesa), natto, vinagre negro sin refinar.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una gráfica que ilustra el efecto del ácido D-aspártico en la producción de colágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos humanos normales.

5 La Figura 2 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-alanina en la producción de colágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos humanos normales.

La Figura 3 es una gráfica que ilustra el efecto del ácido L-aspártico y D-aspártico en la producción de colágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos humanos normales.

10 La Figura 4 es una gráfica que ilustra el efecto de la L-alanina y la D-alanina en la producción de colágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos humanos normales.

La Figura 5 es una gráfica que ilustra el efecto del ácido D-aspártico y la D-alanina en la producción de atelocolágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos humanos normales.

La Figura 6 es una gráfica que ilustra el efecto de la D-alanina en la producción de atelocolágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos humanos normales.

15 **Descripción de las realizaciones**

Los ejemplos de la presente invención descritos a continuación están destinados únicamente a ejemplificar la presente invención en lugar de limitar su alcance técnico. El alcance técnico de la presente invención está limitado solamente por las descripciones en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

20 Efecto promotor de la producción de colágeno del ácido D-aspártico

Métodos

Cultivo celular

25 Se usaron fibroblastos dérmicos neonatales humanos disponibles en el mercado (Cryo NHDF-Neo, fabricados por Sanko Junyaku Co., Ltd.). Se inocularon las células en una placa de 24 cavidades disponible en el mercado para tener  $2 \times 10^5$  células por cavidad. Luego, se cultivaron las células durante cuatro horas en un medio disponible en el mercado para el cultivo celular (D-MEM (1 g/l de glucosa), fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que se complementó con suero fetal bovino al 10 % (denominado más adelante en la presente memoria como "medio estándar") en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y vapor de agua saturado a 37 °C (grados Celsius).

Adición de aminoácido

30 Posteriormente, el medio se cambió a un medio disponible en el mercado para cultivo celular (D-MEM (1 g/l de glucosa), fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) complementado con suero fetal bovino al 0,5 % (denominado más adelante en la presente memoria como "medio bajo en suero") y se cultivó durante aproximadamente un día en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y vapor de agua saturada a 37 °C (grados Celsius). Se añadió ácido D-aspártico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 018-04821) al medio bajo en suero para obtener una concentración de 0,01 μM (micromolar), 0,1 μM (micromolar), 10 μM (micromolar), 100 μM (micromolar), o 320 μM (micromolar). Como control positivo, se añadió L-ascorbil fosfato de magnesio (L-Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n-Hydrate, denominado más adelante en la presente memoria como "APM", fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 013-19641) al medio bajo en suero para obtener una concentración de 150 μM (micromolar), 250 μM (micromolar) o 500 μM (micromolar). Además, se empleó como control negativo el medio bajo en suero descrito anteriormente al que no se había añadido APM ni ácido D-aspártico.

Cuantificación de la producción de colágeno de tipo I

Después de completar el cultivo celular durante dos días, se recogió el sobrenadante del cultivo y se midió la concentración del péptido C-terminal del procolágeno de tipo I (denominado más adelante en la presente memoria como "PIP") producido por los fibroblastos dérmicos neonatales humanos usando el kit de inmunoensayo enzimático de C-péptido de procolágeno de tipo I (fabricado por Takara Bio Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados de la cuantificación

La Figura 1 muestra los resultados del experimento que examina el efecto de agregar ácido D-aspártico en la producción de colágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos neonatales humanos. Las barras de error para cada condición experimental indican las desviaciones estándar de los valores medidos experimentalmente obtenidos al repetir el experimento de cuatro a seis veces en la misma condición. Además, el doble asterisco (\*\*) indica que p es

inferior al 1 % según la prueba de Bonferroni/Dunn.

La concentración de PIP fue de 583 ng/ml en el control negativo. Cuando se había agregado APM en concentraciones de 150  $\mu\text{M}$  (micromolar), 250  $\mu\text{M}$  (micromolar) y 500  $\mu\text{M}$  (micromolar) (es decir, controles positivos), las concentraciones de PIP aumentaron a 1.183 ng/ml, 1.666 ng/ml, y 1.416 ng/ml, respectivamente. Cuando se añadió ácido D-aspartico en concentraciones de 0,01  $\mu\text{M}$  (micromolar), 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar), 10  $\mu\text{M}$  (micromolar), 100  $\mu\text{M}$  (micromolar) y 320  $\mu\text{M}$  (micromolar), las concentraciones de PIP fueron de 1.286 ng/ml, 1.159 ng/ml, 1.117 ng/ml, 1.119 ng/ml y 1.007 ng/ml, respectivamente. Por lo tanto, en comparación con el control negativo, el medio al que se agregó APM o ácido D-aspartico mostró el efecto estadísticamente significativo en la promoción de la producción de colágeno de tipo I en todas las condiciones de concentración. Además, el efecto sobre la promoción de la producción de colágeno de tipo I de ácido D-aspartico en concentraciones de 0,01  $\mu\text{M}$  (micromolar) a 100  $\mu\text{M}$  (micromolar) fue similar al efecto obtenido al usar APM en la concentración más baja, es decir, 150  $\mu\text{M}$  (micromolar), y por lo tanto, se encontró que el ácido D-aspartico tenía un efecto significativamente más potente en la promoción de la producción de colágeno de tipo I que el APM.

Ejemplo 2 (no según la invención)

15 Efecto de promoción en la producción de colágeno de D-alanina

Métodos

El cultivo celular, la adición de aminoácidos y la cuantificación de la producción de colágeno de tipo I se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Como aminoácido, se usó D-alanina (fabricada por Peptide Institute, Inc., 2801) en concentraciones de 0,01  $\mu\text{M}$  (micromolar), 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar), 10  $\mu\text{M}$  (micromolar), 1.000  $\mu\text{M}$  (micromolar), y 17.400  $\mu\text{M}$  (micromolar). Además, se empleó como control negativo el medio bajo en suero descrito anteriormente al que no se había agregado APM ni D-alanina.

Resultados de la cuantificación

La Figura 2 muestra los resultados del experimento que examina el efecto de agregar D-alanina en la producción de colágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos neonatales humanos. Las barras de error para cada condición experimental indican las desviaciones estándar de los valores medidos experimentalmente obtenidos al repetir el experimento de cuatro a seis veces en la misma condición. El asterisco (\*) indica que p es inferior al 5 % según la prueba de Bonferroni/Dunn. El doble asterisco (\*\*) indica que p es inferior al 1 % según la prueba de Bonferroni/Dunn.

La concentración de PIP fue de 551 ng/ml en el control negativo. Cuando se había agregado APM en concentraciones de 150  $\mu\text{M}$  (micromolar), 250  $\mu\text{M}$  (micromolar) y 500  $\mu\text{M}$  (micromolar) (es decir, controles positivos), las concentraciones de PIP aumentaron a 1.183 ng/ml, 1.666 ng/ml, y 1.416 ng/ml, respectivamente, lo que ilustra una producción mayor del colágeno de tipo I. Cuando se añadió D-alanina en concentraciones de 0,01  $\mu\text{M}$  (micromolar), 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar), 10  $\mu\text{M}$  (micromolar), 1.000  $\mu\text{M}$  (micromolar) y 17.400  $\mu\text{M}$  (micromolar), las concentraciones de PIP fueron de 750 ng/ml, 789 ng/ml, 876 ng/ml, 823 ng/ml, y 799 ng/ml, respectivamente. Por lo tanto, en comparación con el control negativo, el medio al que se agregó APT o D-alanina ilustró el efecto estadísticamente significativo en la promoción de la producción de colágeno de tipo I en cada condición de concentración.

Ejemplo 3

Efecto en la promoción de la producción de colágeno de ácido L- y D-aspartico

Métodos

El cultivo celular, la adición de aminoácidos y la cuantificación de la producción de colágeno de tipo I se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Se usó ácido D-aspartico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 018-04821) de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar) y ácido L-aspartico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 013-04832) de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar) como aminoácidos. Además, se empleó como control negativo el medio bajo en suero descrito anteriormente al que no se había añadido ácido L-aspartico ni ácido D-aspartico.

Resultados de la cuantificación

La Figura 3 muestra los resultados del experimento que examina el efecto de agregar ácido L- y D-aspartico en la producción de colágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos neonatales humanos. Las barras de error para cada condición experimental indican las desviaciones estándar de los valores medidos experimentalmente obtenidos al repetir el experimento de seis a doce veces en la misma condición. El doble asterisco (\*\*) indica que p es inferior al 1 % según la prueba de Bonferroni/Dunn.

La concentración de PIP fue de 3,61 ng/ml en el control negativo. Cuando el ácido L-aspartico y el ácido D-aspartico estuvieron en una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar), la concentración de PIP fue de 406 ng/ml y 456 ng/ml, respectivamente. Sobre la base de estos resultados, se encontró que la producción de colágeno de tipo I mejoró con importancia estadística mediante la adición de ácido D-aspartico 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar), pero no mediante la adición de ácido L-aspartico 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar).

## Ejemplo 4 (no según la invención)

Efecto en la promoción de la producción de colágeno de L- y D-alanina

## Métodos

5 El cultivo celular, la adición de aminoácidos y la cuantificación de la producción de colágeno de tipo I se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Se usó D-alanina (fabricada por Peptide Institute, Inc., 2801) de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar) o 150  $\mu\text{M}$  (micromolar) y L-alanina (fabricada por Peptide Institute, Inc., 2701) de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar) o 150  $\mu\text{M}$  (micromolar) como aminoácidos. Además, se empleó como control negativo el medio bajo en suero descrito anteriormente al que no se había agregado L-alanina ni D-alanina.

## Resultados de la cuantificación

10 La Figura 4 muestra los resultados del experimento que examina el efecto de agregar L- y D-alanina en la producción de colágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos neonatales humanos. Las barras de error para cada condición experimental indican las desviaciones estándar de los valores medidos experimentalmente obtenidos al repetir el experimento de seis a doce veces en la misma condición. El asterisco (\*) y el asterisco doble (\*\*) indican que p es inferior al 5 % e inferior al 1 %, respectivamente, según la prueba de Bonferroni/Dunn.

15 La concentración de PIP fue de 361 ng/ml en el control negativo. Cuando se añadió D-alanina en concentraciones de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar) y 150  $\mu\text{M}$  (micromolar), las concentraciones de PIP fueron de 502 ng/ml y 450 ng/ml, respectivamente. Cuando se añadió L-alanina en concentraciones de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar) y 150  $\mu\text{M}$  (micromolar), las concentraciones de PIP fueron de 405 ng/ml y 413 ng/ml, respectivamente. Sobre la base de estos resultados, se encontró que la producción de colágeno de tipo I mejoró con importancia estadística mediante la adición de D-alanina  
20 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar) o 150  $\mu\text{M}$  (micromolar), pero no mediante la adición de L-alanina 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar) o 150  $\mu\text{M}$  (micromolar).

## Ejemplo 5

Efecto en la promoción de la producción de colágeno de ácido D-aspártico y D-alanina

## Métodos

25 El cultivo celular y la adición de aminoácidos se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Se usó ácido D-aspártico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 018-04821) de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar) y D-alanina (fabricada por Peptide Institute, Inc., 2801) de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar) o 0,01  $\mu\text{M}$  (micromolar) como aminoácidos. Además, se empleó como control negativo el medio bajo en suero descrito anteriormente al que no se había agregado ácido D-aspártico ni D-alanina. Como control positivo, se agregó APM al medio bajo en suero descrito anteriormente  
30 para tener una concentración de 250  $\mu\text{M}$  (micromolar). Con el fin de evaluar la cantidad de producción de colágeno de tipo I, se trataron el procolágeno de tipo I y el tropocolágeno producido por los fibroblastos dérmicos neonatales humanos con pepsina (de 800 a 2500 unidades/mg, P7000, fabricado por SIGMA), y se midió la concentración de atelocolágeno de tipo I por ELISA de colágeno humano de tipo I (EC1-E105, fabricado por AC Biotechnologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35 Resultados de la cuantificación (1)

La Figura 5 muestra los resultados del experimento que examina el efecto de agregar ácido D-aspártico y D-alanina en la producción de atelocolágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos neonatales humanos. Las barras de error para cada condición experimental indican las desviaciones estándar de los valores medidos experimentalmente obtenidos al repetir el experimento de cinco a seis veces en la misma condición. El asterisco (\*) y el asterisco doble (\*\*) indican que p es inferior al 5 % e inferior al 1 %, respectivamente, según la prueba de Bonferroni/Dunn.

40 La concentración de atelocolágeno de tipo I fue de 1,8  $\mu\text{g}$  (microgramo)/ml en el control negativo. Cuando se añadió APM a la concentración de 250  $\mu\text{M}$  (es decir, control positivo), la concentración de atelocolágeno de tipo I aumentó a 3,9  $\mu\text{g}$  (microgramos)/ml, exhibiendo la producción mejorada de colágeno de tipo I. Cuando se había agregado D-alanina a la concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar), la concentración de atelocolágeno de tipo I fue de 4,0  $\mu\text{g}$  (microgramo)/ml. Cuando se añadió ácido D-aspártico a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar), la concentración de atelocolágeno tipo I fue de 3,8  $\mu\text{g}$  (microgramo)/ml. Sobre la base de estos resultados, se encontró que la producción de colágeno de tipo I mejoró con importancia estadística mediante la adición de D-alanina o ácido D-aspártico 0,1  $\mu\text{M}$  (micromolar).

## Resultados de la cuantificación (2)

50 La Figura 6 muestra los resultados del experimento que examina el efecto de agregar D-alanina en la producción de atelocolágeno de tipo I en fibroblastos dérmicos neonatales humanos. Las barras de error para cada condición experimental indican las desviaciones estándar de los valores medidos experimentalmente obtenidos al repetir el experimento dos veces en la misma condición.

La concentración de atelocolágeno de tipo I fue de 1,7 µg (microgramo)/ml en el control negativo. Cuando se añadió APM a la concentración de 250 mM (es decir, control positivo), la concentración de atelocolágeno de tipo I aumentó a 2,6 µg (microgramo)/ml, exhibiendo la producción mejorada de colágeno de tipo I. Cuando se añadió D-alanina en una concentración de 0,001 µM (micromolar), la concentración de atelocolágeno tipo I fue de 2,1 µg (microgramo)/ml.

5 Ejemplo 6

10 A continuación, se dan ejemplos de formulación de una composición que comprende ácido D-aspártico, es decir, una preparación en emulsión, un parche, un comprimido, una cápsula blanda, un gránulo, una bebida, una golosina, una galleta, pasta de judías, un aderezo francés, una mayonesa, un pan francés, una salsa de soja, yogur, condimento seco en polvo para arroz, condimento/salsa para natto, natto, vinagre negro sin refinar, crema, crema corporal, gel, una mascarilla "peel-off", una compresa húmeda, una emulsión, una loción para la piel y una preparación en aerosol. Estos ejemplos de formulación son todos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance técnico de la presente invención.

Ejemplo de formulación 1 (preparación en emulsión)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Ácido D-aspártico	0,4
Alcohol behenílico	0,2
Cetanol	0,5
Monoéster de ácido graso de glicerina	1,8
Aceite de ricino hidrogenado polioxietileno (60)	1,0
Vaselina blanca	2,0
Parafina líquida	10,0
Miristato de isopropilo	3,0
Metilpolisiloxano (6 cs)	1,5
Glicerina concentrada	13,0
Dipropilenglicol	2,0
Polímero de carboxivinilo	0,25
Hialuronato de sodio	0,005
Hidróxido de potasio	Cantidad apropiada
Ácido láctico	Cantidad apropiada
Edetato de sodio	Cantidad apropiada
Etilparabeno	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,000

Ejemplo de formulación 2 (preparación en emulsión) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
D-alanina	10
Alcohol behenílico	0,2
Cetanol	0,5
Monoéster de ácido graso de glicerina	1,8
Aceite de ricino hidrogenado polioxietileno (60)	1,0
Vaselina blanca	2,0
Parafina líquida	10,0
Miristato de isopropilo	3,0
Metilpolisiloxano (6 cs)	1,5
Glicerina concentrada	13,0
Dipropilenglicol	2,0

## ES 2 733 537 T3

Polímero de carboxivinilo	0,25
Hialuronato de sodio	0,005
Hidróxido de potasio	Cantidad apropiada
Ácido láctico	Cantidad apropiada
Edetato de sodio	Cantidad apropiada
Etilparabeno	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,000

### Ejemplo de formulación 3 (parche)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Ácido D-aspártico	0,3
Ácido poliacrílico	3,0
Poliacrilato de sodio	2,5
Gelatina	0,5
Carboximetil celulosa sódica	4,0
Alcohol polivinílico	0,3
Glicerina concentrada	14,0
1,3-butilenglicol	12,0
Hidróxido de aluminio	0,1
Edetato de sodio	0,03
Metilparabeno	0,1
Agua purificada	Resto
	100,00

### Ejemplo de formulación 4 (parche) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
D-alanina	15,0
Ácido poliacrílico	3,0
Poliacrilato de sodio	2,5
Gelatina	0,5
Carboximetil celulosa sódica	4,0
Alcohol polivinílico	0,3
Glicerina concentrada	14,0
1,3-butilenglicol	12,0
Hidróxido de aluminio	0,1
Edetato de sodio	0,03
Metilparabeno	0,1
Agua purificada	Resto
	100,00

## ES 2 733 537 T3

### Ejemplo de formulación 5 (comprimido)

(Composición)	Contenido (mg/comprimido)
Ácido D-aspártico	360,5
Lactosa	102,4
Carboximetil celulosa sódica	29,9
Hidroxipropilcelulosa	6,8
Estearato de magnesio	5,2
Celulosa cristalina	10,2
	515,0

### Ejemplo de formulación 6 (comprimido)

(Composición)	Contenido (mg/comprimido)
Éster de sacarosa	70
Celulosa cristalina	74
Metilcelulosa	36
Glicerina	25
Ácido D-aspártico	475
N-acetilglucosamina	200
Ácido hialurónico	150
Vitamina E	30
Vitamina B6	20
Vitamina B2	10
Ácido $\alpha$ (alfa)-lipoico	20
Coenzima Q10	40
Ceramida (extracto de konjac)	50
L-prolina	300
	1500

### 5 Ejemplo de formulación 7 (cápsula blanda)

(Composición)	Contenido (mg/cápsula)
Aceite de soja comestible	530
Extracto de <i>Eucommia ulmoides</i>	50
Extracto de ginseng	50
Ácido D-aspártico	100
Jalea real	50
Maca	30
GABA	30
Cera de abejas	60
Gelatina	375
Glicerina	120
Éster de ácido graso de glicerina	105
	1.500

Ejemplo de formulación 8 (cápsula blanda)

(Composición)	Contenido (mg/cápsula)
Aceite de germen de arroz integral	659
Ácido D-aspártico	500
Resveratrol	1
Extracto de germen de loto	100
Elastina	180
ADN	30
Ácido fólico	30
	1.500

Ejemplo de formulación 9 (gránulo)

(Composición)	Contenido (mg/paquete)
Ácido D-aspártico	400
Vitamina C	100
Isoflavona de soja	250
Lactosa reducida	300
Oligosacárido de soja	36
Eritritol	36
Dextrina	30
Agente saborizante	24
Ácido cítrico	24
	1.200

5 Ejemplo de formulación 10 (bebida)

(Composición)	Contenido (g/60 ml)
Extracto de <i>Eucommia ulmoides</i>	1,6
Extracto de ginseng	1,6
Ácido D-aspártico	0,2
Jarabe de maltosa reducida	28
Eritritol	8
Ácido cítrico	2
Agente saborizante	1,3
N-acetilglucosamina	1
Hialuronato de sodio	0,5
Vitamina E	0,3
Vitamina B6	0,2
Vitamina B2	0,1
Ácido $\alpha$ (alfa)-lipoico	0,2
Coenzima Q10	1,2
Ceramida (extracto de konjac)	0,4
L-prolina	2
Agua purificada	Resto
	60

## ES 2 733 537 T3

Ejemplo de formulación 11 (bebida) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (g/60 ml)
Extracto de <i>Eucommia ulmoides</i>	1,6
Extracto de ginseng	1,6
D-alanina	8
Jarabe de maltosa reducida	28
Eritritol	8
Ácido cítrico	2
Agente saborizante	1,3
N-acetilglucosamina	1
Hialuronato de sodio	0,5
Vitamina E	0,3
Vitamina B6	0,2
Vitamina B2	0,1
Ácido $\alpha$ (alfa)-lipoico	0,2
Coenzima Q10	1,2
Ceramida (extracto de konjac)	0,4
L-prolina	2
Agua purificada	Resto
	60

Ejemplo de formulación 12 (golosina)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Azúcar	50
Jarabe	48
Ácido D-aspártico	1
Agente saborizante	1
	100

5

Ejemplo de formulación 13 (galleta)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Harina floja	45,0
Mantequilla	17,5
Azúcar blanca	20,0
Ácido D-aspártico	4,0
Huevo	12,5
Agente saborizante	1,0
	100,0

Método para producir el ejemplo de formulación 13 (galleta)

Se agregó el azúcar blanca en etapas a la mantequilla mientras se agitaba, a lo que se agregó un huevo, ácido D-aspártico y un agente saborizante mientras se agitaba. Después de mezclar bien, se agregó harina floja uniformemente tamizada y se agitó a baja velocidad, y se dejó reposar la masa en una nevera. Posteriormente, se moldeó y se horneó

10

durante 15 minutos a 170 °C (grados Celsius) para obtener una galleta.

Ejemplo de formulación 14 (pasta de judías)

(Composición)	Contenido (g)
Soja	1.000
Arroz malteado	1.000
Sal	420
Ácido D-aspártico	158
Agua	Resto
	4.000

Método para producir el ejemplo de formulación 14 (pasta de judías)

- 5 Se mezcló bien el arroz malteado con una sal. Se dejó en remojo la soja lavada durante la noche en tres veces su volumen de agua, que luego se la escurrió, y se agregó agua limpia mientras hervía, y se vertió en un colador para recoger el caldo (fluido de tanemizu), en el que se disolvió el ácido D-aspártico al 10 % p/v. De inmediato, se trozaron las judías hervidas, se las combinó con arroz malteado mezclado con sal, a lo que se agregó el fluido de tanemizu que contenía ácido D-aspártico disuelto allí y se amasó de manera uniforme para obtener una dureza similar a la arcilla.
- 10 Se prepararon las empanaditas y se las acomodó en un recipiente de forma compacta sin que quede ningún espacio vacío, y se alisó la superficie del contenido y se lo tapó herméticamente con film transparente. Después de tres meses, se transfirió el contenido a un nuevo recipiente y se alisó la superficie y se lo tapó herméticamente con film transparente. En lugar de agregar ácido D-aspártico al fluido de tanemizu, se puede emplear arroz malteado que produce una gran cantidad de ácido D-aspártico. Dicho arroz malteado puede seleccionarse mediante la cuantificación del ácido D-aspártico a través del método descrito en la publicación de patente japonesa sin examinar N.º 2008-185558. Como alternativa, puede complementarse una pasta de judías disponible en el mercado con ácido D-aspártico o con una sal del mismo.
- 15

Ejemplo de formulación 15 (aderezo francés)

(Composición)	Contenido (g)
Aceite comestible	27,45
Vinagre	30,45
Cloruro de sodio	0,9
Ácido D-aspártico	0,2
Pimienta	1,0
	60,0

20 Ejemplo de formulación 16 (aderezo francés) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (g)
Aceite comestible	27,0
Vinagre	30,0
Cloruro de sodio	0,9
D-alanina	1,1
Pimienta	1,0
	60,0

Método para producir los ejemplos de formulación 15 y 16 (aderezo francés)

Se combinó el vinagre con cloruro de sodio y ácido D-aspártico o D-alanina, y luego, se agitó a fondo para disolverlo. Se agregó aceite comestible a la mezcla y la mezcla se agitó bien y luego, se agregó pimienta.

Ejemplo de formulación 17 (mayonesa)

(Composición)	Contenido (g)
Aceite comestible	134,5
Vinagre	5
Cloruro de sodio	0,9
Ácido D-aspártico	0,5
Yema de huevo	18
Azúcar	0,2
Pimienta	0,9
	160,0

Ejemplo de formulación 18 (mayonesa) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (g)
Aceite comestible	134,0
Vinagre	5
Cloruro de sodio	0,9
D-alanina	1
Yema de huevo	18
Azúcar	0,2
Pimienta	0,9
	160,0

5 Método para producir los ejemplos de formulación 17 y 18 (mayonesa)

Se combinó una yema de huevo (a temperatura ambiente) con vinagre, cloruro de sodio, ácido D-aspártico o D-alanina y pimienta, y se agitó a fondo con un batidor. Se continuó batiendo mientras se agregaba el aceite comestible en etapas para formar una emulsión. Por último, se agregó azúcar y se agitó la mezcla.

Ejemplo de formulación 19 (pan francés)

(Composición)	Contenido (g)
Harina de fuerza	140
Harina floja	60
Cloruro de sodio	3
Azúcar	6
Ácido D-aspártico	2
Levadura seca	4
Agua tibia	128
	343

10

Ejemplo de formulación 20 (pan francés) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (g)
Harina de fuerza	140
Harina floja	60
Cloruro de sodio	3
Azúcar	6

D-alanina	17
Levadura seca	4
Agua tibia	120
	350

Método para producir los ejemplos de formulación 19 y 20 (pan francés)

5 Se mezcló agua tibia con 1 g de azúcar y levadura seca, que luego se dejó fermentar. Se colocó en un recipiente harina de fuerza, harina débil, cloruro de sodio, 5 g de azúcar y ácido D-aspártico o D-alanina en donde se colocó la levadura fermentada previamente. Después de amasar a fondo hasta formar una masa en forma de bollo, se llevó a cabo una fermentación primaria a 30 °C (grados Celsius). Se amasó nuevamente la masa y se la dejó reposar, y luego, se le dio la forma adecuada, y se sometió a una fermentación final usando una máquina de fermentación electrónica. Después de realizar los cortes, se horneó durante 30 minutos a 220 °C (grados Celsius).

Ejemplo de formulación 21 (salsa de soja)

(Composición)	Contenido (g)
Salsa de soja disponible en el mercado	996
Ácido D-aspártico	4
	1.000

10

Ejemplo de formulación 22 (salsa de soja) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (g)
Salsa de soja disponible en el mercado	900
D-alanina	100
	1.000

Método para producir los ejemplos de formulación 21 y 22 (salsa de soja)

15 Se complementó la salsa de soja disponible en el mercado con ácido D-aspártico o D-alanina y se agitó a fondo. En lugar de agregar ácido D-aspártico o D-alanina, o una de sus sales, se puede emplear arroz malteado que produce una gran cantidad de ácido D-aspártico o D-alanina para fermentar la salsa de soja. Dicho arroz malteado puede seleccionarse mediante la cuantificación del ácido D-aspártico o D-alanina a través del método descrito en la publicación de patente japonesa sin examinar N.º 2008-185558.

Ejemplo de formulación 23 (yogur)

(Composición)	Contenido (g)
Leche	898
<i>L. bulgaricus</i>	50
<i>S. thermophilus</i>	50
Ácido D-aspártico	2
	1.000

20

Ejemplo de formulación 24 (yogur) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (g)
Leche	850
<i>L. bulgaricus</i>	50
<i>S. thermophilus</i>	50
D-alanina	50
	1.000

Método para producir los ejemplos de formulación 23 y 24 (yogur)

5

La fermentación se llevó a cabo entre 40 y 45 °C (grados Celsius). Se pueden emplear otros organismos de semillas de fermentación disponibles en el mercado y el yogur disponible en el mercado puede complementarse con ácido D-aspártico o D-alanina. En lugar de agregar ácido D-aspártico o D-alanina, o una de sus sales, se puede emplear un organismo de semillas que produce una gran cantidad de ácido D-aspártico o D-alanina. Tal organismo puede seleccionarse mediante la cuantificación del ácido D-aspártico o D-alanina a través del método descrito en la publicación de patente japonesa sin examinar N.º 2008-185558.

Ejemplo de formulación 25 (condimento seco en polvo para arroz)

(Composición)	Contenido (g)
Ácido D-aspártico	50
Laver	15
L-glutamato de sodio	10
Cloruro de sodio	2
Sésamo tostado	10
Caballa seca en escamas	10
Azúcar	1
Salsa de soja	2
	100

10

Ejemplo de formulación 26 (condimento/salsa para natto)

(Composición)	Contenido (g)
Salsa para natto disponible en el mercado	9,8
Ácido D-aspártico	0,2
	10

Ejemplo de formulación 27 (condimento/salsa para natto) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (g)
Salsa para natto disponible en el mercado	9
D-alanina	1
	10

15

Ejemplo de formulación 28 (natto)

(Composición)	Contenido (g)
Natto disponible en el mercado	19,9
Ácido D-aspártico	0,1
	20

Método para producir el ejemplo de formulación 28 (natto)

20

En lugar de agregar ácido D-aspártico, o una sal del mismo, se puede emplear un organismo que produzca una gran cantidad de ácido D-aspártico para producir natto. Tal organismo puede seleccionarse mediante la cuantificación del ácido D-aspártico a través del método descrito en la publicación de patente japonesa sin examinar N.º 2008-185558.

Ejemplo de formulación 29 (vinagre negro sin refinar)

(Composición)	Contenido (g)
Vinagre negro sin refinar disponible en el mercado	996
Ácido D-aspártico	4
	1.000

Ejemplo de formulación 30 (vinagre negro sin refinar) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (g)
Vinagre negro sin refinar disponible en el mercado	900
D-alanina	100
	1.000

5 Método para producir los ejemplos de formulación 29 y 30 (vinagre negro sin refinar)

En lugar de agregar ácido D-aspártico o D-alanina, o una de sus sales, se puede emplear un organismo que produzca una gran cantidad de ácido D-aspártico o D-alanina para producir vinagre, vinagre negro o vinagre sin refinar. Tal organismo puede seleccionarse mediante la cuantificación del ácido D-aspártico o D-alanina a través del método descrito en la publicación de patente japonesa sin examinar N.º 2008-185558.

10 Ejemplo de formulación 31 (crema)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Parafina líquida	3
Vaselina blanca	1
Dimetil polisiloxano	1
Alcohol estearílico	1,8
Alcohol behenílico	1,6
Glicerina	8
Dipropilenglicol	5
Aceite de nueces de macadamia	2
Aceite hidrogenado	3
Escualeno	6
Ácido esteárico	2
Hidroestearato de colesterilo	0,5
2-etilhexanoato de cetilo	4
Aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado	0,5
Monoestearato de glicerilo autoemulsionable	3
Hidróxido de potasio	0,15
Hexametáfosfato de sodio	0,05
Trimetilglicina	2
Ascorbil tocoferil fosfato de potasio	1
Acetato de tocoferilo	0,1
Ácido D-aspártico	0,4
Parabeno	Cantidad apropiada
Edetato trisódico	0,05
4-t-Butil-4'-metoxidibenzoilmetano	0,05
Dimetoxicinamato de gliceril etilhexanoato	0,05

## ES 2 733 537 T3

Colorante	Cantidad apropiada
Polímero de carboxivinilo	0,05
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 32 (crema) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Parafina líquida	3
Vaselina blanca	1
Dimetil polisiloxano	1
Alcohol estearílico	1,8
Alcohol behenílico	1,6
Glicerina	8
Dipropilenglicol	5
Aceite de nueces de macadamia	2
Aceite hidrogenado	3
Escualeno	6
Ácido esteárico	2
Hidroestearato de colesterilo	0,5
2-etilhexanoato de cetilo	4
Aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado	0,5
Monoestearato de glicerilo autoemulsionable	3
Hidróxido de potasio	0,15
Hexametáfosfato de sodio	0,05
Trimetilglicina	2
Ascorbil tocoferil fosfato de potasio	1
Acetato de tocoferilo	0,1
D-alanina	10
Parabeno	Cantidad apropiada
Edetato trisódico	0,05
4-t-Butil-4'-metoxi dibenzoilmetano	0,05
Dimetoxicinamato de etilhexanoatode glicerilo	0,05
Colorante	Cantidad apropiada
Polímero de carboxivinilo	0,05
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 33 (crema corporal)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Dimetil polisiloxano de	3
Decametil ciclopentasiloxano	13
Dodecametil ciclohexasiloxano	12
Copolímero de polioxietileno y metilpolisiloxano	1
Etanol	2

ES 2 733 537 T3

Isopropanol	1
Glicerina	3
Dipropilenglicol	5
Polietilen-glicol 6000	5
Hexametafosfato de sodio	0,05
Acetato de tocoferilo	0,1
Ácido D-aspártico	0,4
Extracto de <i>Foeniculum vulgare</i> (hinojo)	0,1
Extracto de <i>Hamamelis virginiana</i> (avellano de bruja)	0,1
Extracto de ginseng	0,1
L-Mentol	Cantidad apropiada
Éster de ácido peroxibenzoico (parabeno)	Cantidad apropiada
Edetato trisódico	0,05
Dimorfolinopiridazinona	0,01
Trisiloxano de isopentil trimetoxicinamato	0,1
Óxido de hierro amarillo	Cantidad apropiada
Titanato de cobalto	Cantidad apropiada
Hectorita de dimetil diestearilamonio	1,5
Alcohol polivinílico	0,1
Hidroxietilcelulosa	0,1
Trimetilsiloxisilicato	2
Agente saborizante	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 34 (crema corporal) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Dimetil polisiloxano	3
Decametil ciclopentasiloxano	13
Dodecametil ciclohexasiloxano	12
Copolímero de polioxietileno y metilpolisiloxano	1
Etanol	2
Isopropanol	1
Glicerina	3
Dipropilenglicol	5
Polietilen-glicol 6000	5
Hexametafosfato de sodio	0,05
Acetato de tocoferilo	0,1
D-alanina	10
Extracto de <i>Foeniculum vulgare</i> (hinojo)	0,1
Extracto de <i>Hamamelis virginiana</i> (avellano de bruja)	0,1
Extracto de ginseng	0,1
L-Mentol	Cantidad apropiada
Éster de ácido peroxibenzoico(Parabeno)	Cantidad apropiada

ES 2 733 537 T3

Edetato trisódico	0,05
Dimorfolinopiridazinona	0,01
Isopentil trimetoxicinamatoTrisiloxano	0,1
Óxido de hierro amarillo	Cantidad apropiada
Titanato de cobalto	Cantidad apropiada
Hectorita de dimetil diestearilamonio	1,5
Alcohol polivinílico	0,1
Hidroxietilcelulosa	0,1
Trimetilsiloxisilicato	2
Agente saborizante	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 35 (gel)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Dimetil polisiloxano	5
Glicerina	2
1,3-butilenglicol	5
Polietilen-glicol 1500	3
Polietilen-glicol 20000	3
Etilhexanoato de cetilo	3
Ácido cítrico	0,01
Citrato de sodio	0,1
Hexametáfosfato de sodio	0,1
Glicirricinato de dipotasio	0,1
Ácido D-aspártico	0,4
Acetato de tocoferilo	0,1
Extracto de raíz de <i>Scutellaria baicalensis</i>	0,1
Extracto de <i>Saxifraga sarmentos</i>	0,1
Edetato trisódico	0,1
Goma xantana	0,3
Acrilatos/polímero cruzado de alquilo C10-30 acrilato (Pemulen TR-2)	0,05
Agar en polvo	1,5
Fenoxietanol	Cantidad apropiada
Dibutilhidroxitolueno	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 36 (gel) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Dimetil polisiloxano	5
Glicerina	2
1,3-butilenglicol	5
Polietilen-glicol 1500	3

ES 2 733 537 T3

Polietilen-glicol 20000	3
Etilhexanoato de cetilo	3
Ácido cítrico	0,01
Citrato de sodio	0,1
Hexametáfosfato de sodio	0,1
Glicirricinato de dipotasio	0,1
D-alanina	10
Acetato de tocoferilo	0,1
Extracto de raíz de <i>Scutellaria baicalensis</i>	0,1
Extracto de <i>Saxifraga sarmentos</i>	0,1
Edetato trisódico	0,1
Goma xantana	0,3
Acrilatos/polímero cruzado de alquilo C10-30 acrilato (Pemulen TR-2)	0,05
Agar en polvo	1,5
Fenoxietanol	Cantidad apropiada
Dibutilhidroxitolueno	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 37 (mascarilla "peel-off")

(Composición)	Contenido (% en masa)
Etanol	10
1,3-butilenglicol	6
Polietilen-glicol 4000	2
Aceite de oliva	1
Aceite de nueces de macadamia	1
Ácido fitoestearil hidroxisteárico	0,05
Ácido láctico	0,05
Lactato de sodio	0,1
Ascorbil sulfato de disodio	0,1
Ascorbil tocoferil fosfato de potasio	0,1
Ácido D-aspártico	0,4
Colágeno de pescado	0,1
Sulfato de condroitina sódica	0,1
Celulosa de carboximetilo sódico	0,2
Alcohol polivinílico	12
Éster de ácido peroxibenzoico (parabeno)	Cantidad apropiada
Agente saborizante	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

## ES 2 733 537 T3

Ejemplo de formulación 38 (mascarilla "peel-off") (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Metanol	10
1,3-butilenglicol	6
Polietilen-glicol 4000	2
Aceite de oliva	1
Aceite de nueces de macadamia	1
Ácido fitoestearil hidroxisteárico	0,05
Ácido láctico	0,05
Lactato de sodio	0,1
Ascorbil sulfato de disodio	0,1
Ascorbil tocoferil fosfato de potasio	0,1
D-alanina	15
Colágeno de pescado	0,1
Sulfato de condroitina sódica	0,1
Celulosa de carboximetilo sódico	0,2
Alcohol polivinílico	12
Éster de ácido peroxibenzoico (parabeno)	Cantidad apropiada
Agente saborizante	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 39 (compresa húmeda)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Glicerina	1
1,3-butilenglicol	8
Xilitol	2
Polietilen-glicol 1500	2
Aceite de romero	0,01
Aceite de salvia	0,1
Ácido cítrico	0,02
Citrato de sodio	0,08
Hexametafosfato de sodio	0,01
Hidroxipropil-β (beta)-ciclodextrina	0,1
Ácido D-aspártico	0,25
Extracto de abedul	0,1
Aceite de lavanda	0,01
Goma xantana	0,05
Polímero de carboxivinilo	0,15
Éster de ácido peroxibenzoico (parabeno)	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

## ES 2 733 537 T3

Ejemplo de formulación 40 (compresa húmeda) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Glicerina	1
1,3-butilenglicol	8
Xilitol	2
Polietilen-glicol 1500	2
Aceite de romero	0,01
Aceite de salvia	0,1
Ácido cítrico	0,02
Citrato de sodio	0,08
Hexametáfosfato de sodio	0,01
Hidroxipropil- $\beta$ (beta)-ciclodextrina	0,1
D-alanina	8
Extracto de abedul	0,1
Aceite de lavanda	0,01
Goma xantana	0,05
Polímero de carboxivinilo	0,15
Éster de ácido peroxibenzoico (parabeno)	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 41 (emulsión)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Parafina líquida	7
Vaselina blanca	3
Decametil ciclopentasiloxano	2
Alcohol behenílico	1,5
Glicerina	5
Dipropilenglicol	7
Polietilen-glicol 1500	2
Aceite de jojoba	1
Ácido isoesteárico	0,5
Ácido esteárico	0,5
Ácido behénico	0,5
Tetra(2-etilhexanoato) de pentaeritritol	3
2-etilhexanoato de cetilo	3
Monoestearato de glicerina	1
Monoestearato de polioxietileno-glicerina	1
Hidróxido de potasio	0,1
Hexametáfosfato de sodio	0,05
Glicirretinato de estearilo	0,05
Ácido D-aspártico	0,2
Extracto de jalea real	0,1
Extracto de levadura	0,1

ES 2 733 537 T3

Acetato de tocoferilo	0,1
Hialuronato de sodio acetilado	0,1
Edetato trisódico	0,05
4-t-Butil-4'-metoxidibenzoilmetano	0,1
Parametoxicinamato de 2-etilhexilo	0,1
Polímero de carboxivinilo	0,15
Parabeno	Cantidad apropiada
Agente saborizante	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 42 (emulsión) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Parafina líquida	7
Vaselina blanca	3
Decametilpentasiloxano	2
Alcohol behenílico	1,5
Glicerina	5
Dipropilenglicol	7
Polietilen-glicol 1500	2
Aceite de jojoba	1
Ácido isoesteárico	0,5
Ácido esteárico	0,5
Ácido behénico	0,5
Tetra(2-etilhexanoato) de pentaeritritol	3
2-etilhexanoato de cetilo	3
Monoestearato de glicerina	1
Monoestearato de polioxietileno glicerina	1
Hidróxido de potasio	0,1
Hexametáfosfato de sodio	0,05
Glicirretinato de estearilo	0,05
D-alanina	5
Extracto de jalea real	0,1
Extracto de levadura	0,1
Acetato de tocoferilo	0,1
Hialuronato de sodio acetilado	0,1
Edetato trisódico	0,05
Metano de 4-t-butil-4'-metoxidibenzoilo	0,1
Parametoxicinamato de 2-etilhexilo	0,1
Polímero de carboxivinilo	0,15
Parabeno	Cantidad apropiada
Agente saborizante	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

## ES 2 733 537 T3

### Ejemplo de formulación 43 (emulsión)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Dimetil polisiloxano	2
Alcohol behenílico	1
Alcohol batílico	0,5
Glicerina	5
1,3-butilenglicol	7
Eritritol	2
Aceite hidrogenado	3
Escualeno	6
Tetra(2-etilhexanoato) de pentaeritritol	2
Isoestearato de polioxietilenglicerilo	1
Monoestearato de polioxietilenglicerilo	1
Ácido D-aspártico	0,3
Hidróxido de potasio	Cantidad apropiada
Hexametafosfato de sodio	0,05
Fenoxietanol	Cantidad apropiada
Polímero de carboxivinilo	0,1
Agua purificada	Resto
	100,00

### Ejemplo de formulación 44 (emulsión) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Dimetil polisiloxano	2
Alcohol behenílico	1
Alcohol batílico	0,5
Glicerina	5
1,3-butilenglicol	7
Eritritol	2
Aceite hidrogenado	3
Escualeno	6
Tetra(2-etilhexanoato) de pentaeritritol	2
Isoestearato de polioxietilenglicerilo	1
Monoestearato de polioxietilenglicerilo	1
D-alanina	10
Hidróxido de potasio	Cantidad apropiada
Hexametafosfato de sodio	0,05
Fenoxietanol	Cantidad apropiada
Polímero de carboxivinilo	0,1
Agua purificada	Resto
	100,00

## ES 2 733 537 T3

Ejemplo de formulación 45 (loción para la piel)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Alcohol etílico	5
Glicerina	1
1,3-butilenglicol	5
Polioxietilen polioxipropilen decil éter	0,2
Hexametáfosfato de sodio	0,03
Trimetilglicina	1
Poliasparaginato de sodio	0,1
Ascorbil tocoferil fosfato de potasio	0,1
Tiotaurina	0,1
Ácido D-aspártico	0,3
Edetato trisódico	0,1
Polímero de carboxivinilo	0,05
Hidróxido de potasio	0,02
Fenoxietanol	Cantidad apropiada
Agente saborizante	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 46 (loción para la piel) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Alcohol etílico	5
Glicerina	1
1,3-butilenglicol	5
Ascorbil tocoferil fosfato de potasio	0,2
Hexametáfosfato de sodio	0,03
Trimetilglicina	1
Poliasparaginato de sodio	0,1
Ascorbil tocoferil fosfato de potasio	0,1
Tiotaurina	0,1
D-alanina	10
Edetato trisódico	0,1
Polímero de carboxivinilo	0,05
Hidróxido de potasio	0,02
Fenoxietanol	Cantidad apropiada
Agente saborizante	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

5 Ejemplo de formulación 47 (loción para la piel)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Etanol	10
Dipropilenglicol	1

ES 2 733 537 T3

Polietilen-glicol 1000	1
Metilglucósido de polioxietileno	1
Aceite de jojoba	0,01
Tri(2-etilhexanoato) de glicerilo	0,1
Aceite de ricino hidrogenado polioxietileno	0,2
Diisosteato de poliglicerilo	0,15
N-estearoil-L-glutamato de sodio	0,1
Ácido cítrico	0,05
Citrato de sodio	0,2
Hidróxido de potasio	0,4
Glicirricinato de dipotasio	0,1
Hidrocloruro de arginina	0,1
Ácido L-ascórbico-2-glucósido	2
Ácido D-aspártico	0,2
Edetato trisódico	0,05
4-metoxicinamato de octilo	0,01
Dibutilhidroxil tolueno	Cantidad apropiada
Parabeno	Cantidad apropiada
Agua de mar profunda	3
Agente saborizante	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 48 (loción para la piel) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Etanol	10
Dipropilenglicol	1
Polietilen-glicol 1000	1
Metilglucósido de polioxietileno	1
Aceite de jojoba	0,01
Tri(2-etilhexanoato) de glicerilo	0,1
Aceite de ricino hidrogenado polioxietileno	0,2
Diisosteato de poliglicerilo	0,15
N-estearil-L-glutamato de sodio	0,1
Ácido cítrico	0,05
Citrato de sodio	0,2
Hidróxido de potasio	0,4
Glicirricinato de dipotasio	0,1
Hidrocloruro de arginina	0,1
Ácido L-ascórbico-2-glucósido	2
D-alanina	12
Edetato trisódico	0,05
4-metoxicinamato de octilo	0,01
Dibutilhidroxitolueno	Cantidad apropiada

## ES 2 733 537 T3

Parabeno	Cantidad apropiada
Agua de mar profunda	3
Agente saborizante	Cantidad apropiada
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 49 (solución madre de preparación de urea en aerosol de uso externo)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Etanol	15,0
Aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 50	1,5
Difenhidramina	1,0
Dibucaína	2,0
Acetato de tocoferilo	0,5
Ácido D-aspártico	0,1
Ácido isoesteárico	0,1
1,3-butilenglicol	3,0
Polietileno-glicol 400	3,0
Alcanfor	0,05
Urea	20,0
Agua purificada	Resto
	100,00

Ejemplo de formulación 50 (solución madre de preparación de urea en aerosol de uso externo) (no según la invención)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Etanol	15,0
Aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 50	1,5
Difenhidramina	1,0
Dibucaína	2,0
Acetato de tocoferilo	0,5
D-alanina	5
Ácido isoesteárico	0,1
1,3-butilenglicol	3,0
Polietileno-glicol 400	3,0
Alcanfor	0,05
Urea	20,0
Agua purificada	Resto
	100,00

5

Ejemplo de formulación 51 (urea en aerosol)

(Composición)	Contenido (% en masa)
Solución madre de preparación de urea en aerosol de uso externo	65,0
Éter dimetílico	35,0
	100,00

Método de llenado para el ejemplo de formulación 51 (urea en aerosol)

La solución madre de la preparación de urea en aerosol para uso externo y éter dimetílico se rellena en una lata de aluminio para aerosol resistente a la presión cuya superficie interna está recubierta con teflón (marca registrada) para preparar una preparación en aerosol.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso cosmético, no terapéutico, de uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido D-aspártico y/o sales del mismo para suprimir y/o atenuar arrugas de la piel mediante estimulación de la producción de colágeno.
- 5 2. El uso cosmético, no terapéutico, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho uno o más compuestos se proporcionan en forma de una preparación de uso externo para la piel.
3. El uso cosmético, no terapéutico, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho uno o más compuestos se proporcionan en forma de alimento.
- 10 4. Método cosmético para suprimir y/o atenuar las arrugas de la piel mediante estimulación de la producción de colágeno, que comprende la etapa de administrar uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido D-aspártico y/o sales del mismo a un sujeto.
5. El método cosmético de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho uno o más compuestos se administran de manera transdérmica en forma de una preparación de uso externo para la piel.
- 15 6. El método cosmético de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho uno o más compuestos se administran oralmente en forma de alimento.
7. Uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido D-aspártico y/o sales del mismo para su uso con el fin de suprimir y/o atenuar una afección de la piel causada por el fotoenvejecimiento, mediante estimulación de la producción de colágeno.
- 20 8. Uso de uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido D-aspártico y/o sales del mismo para preparar un cosmético con el fin de atenuar las arrugas de la piel, mediante estimulación de la producción de colágeno.

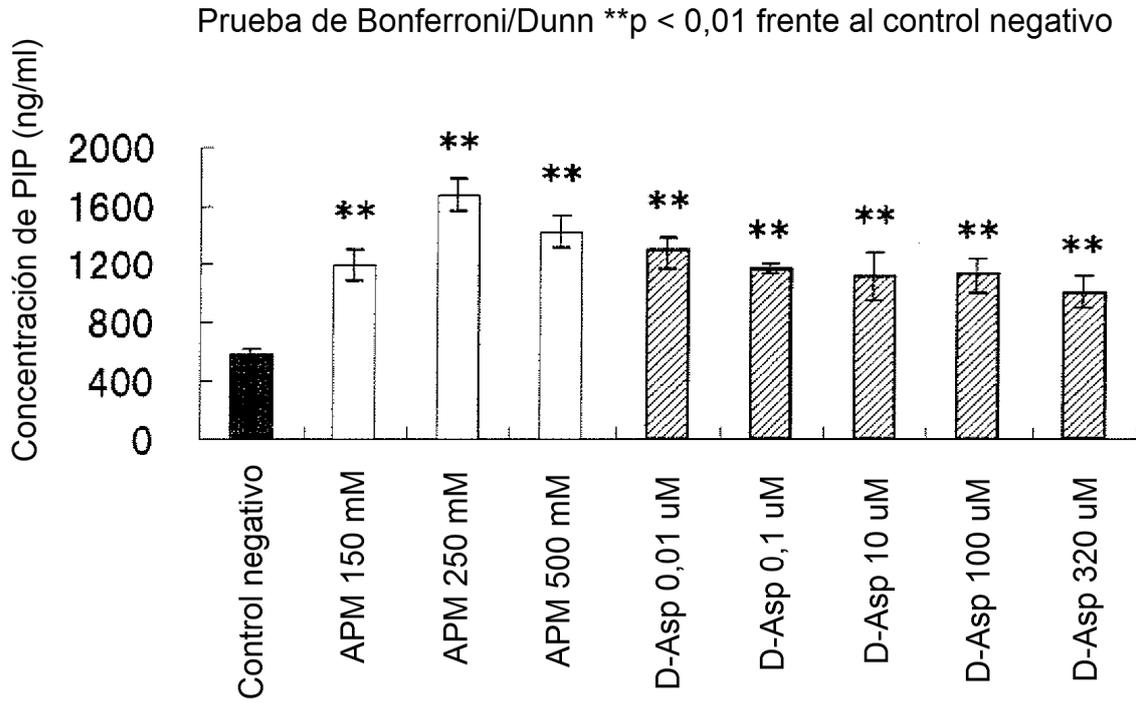


FIG.1

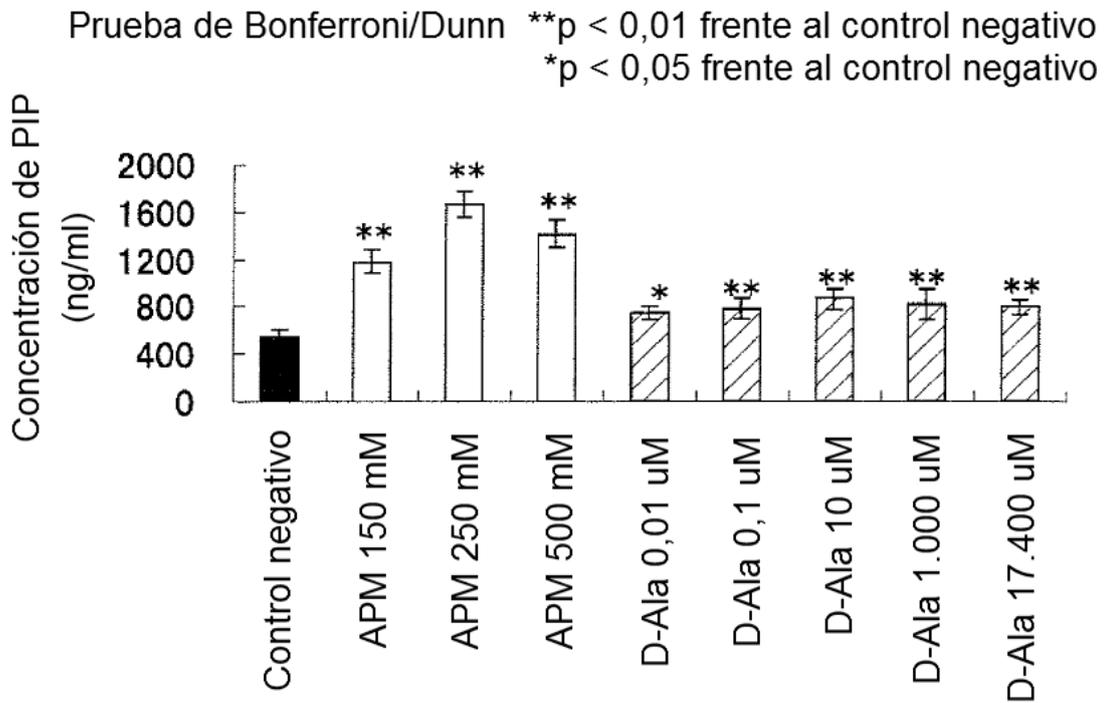


FIG.2

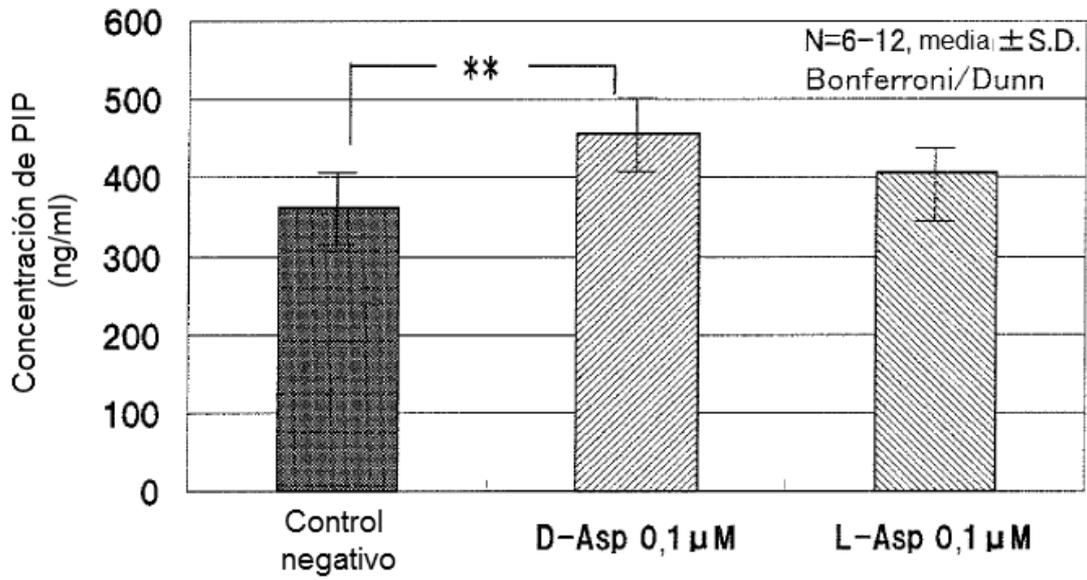


FIG.3

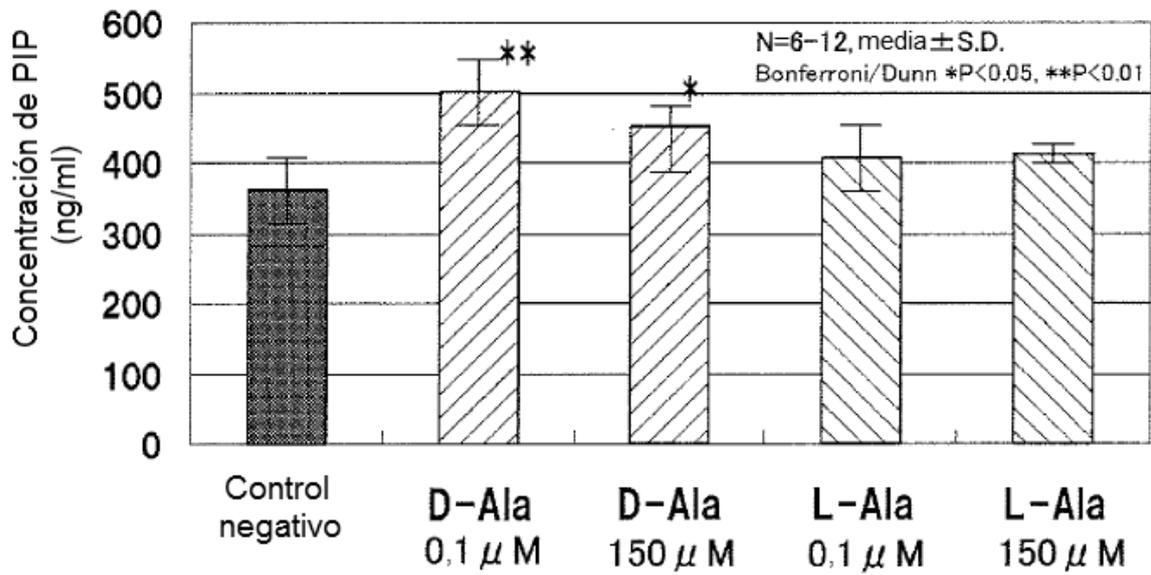


FIG.4

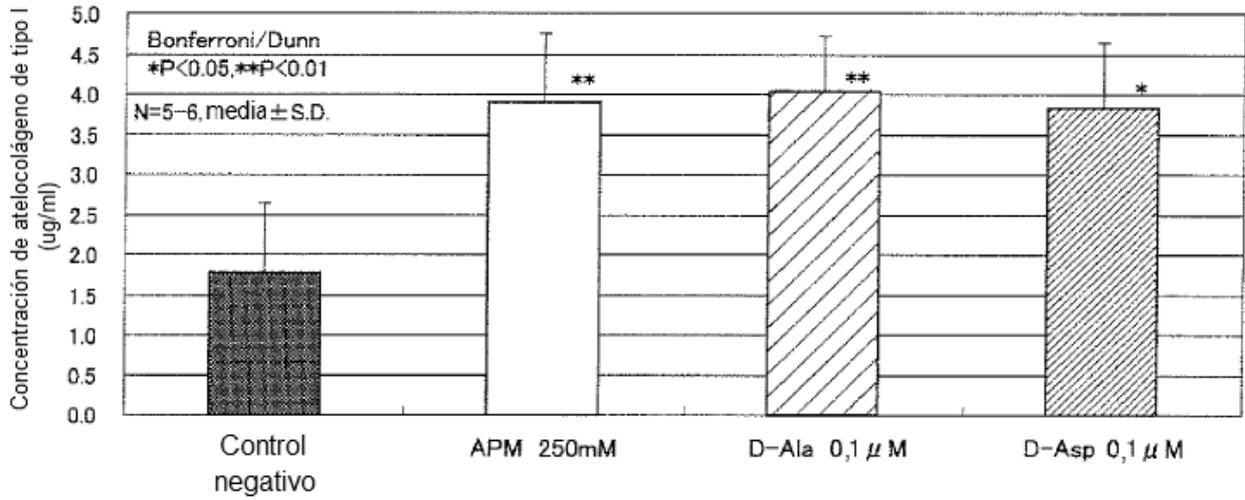


FIG.5

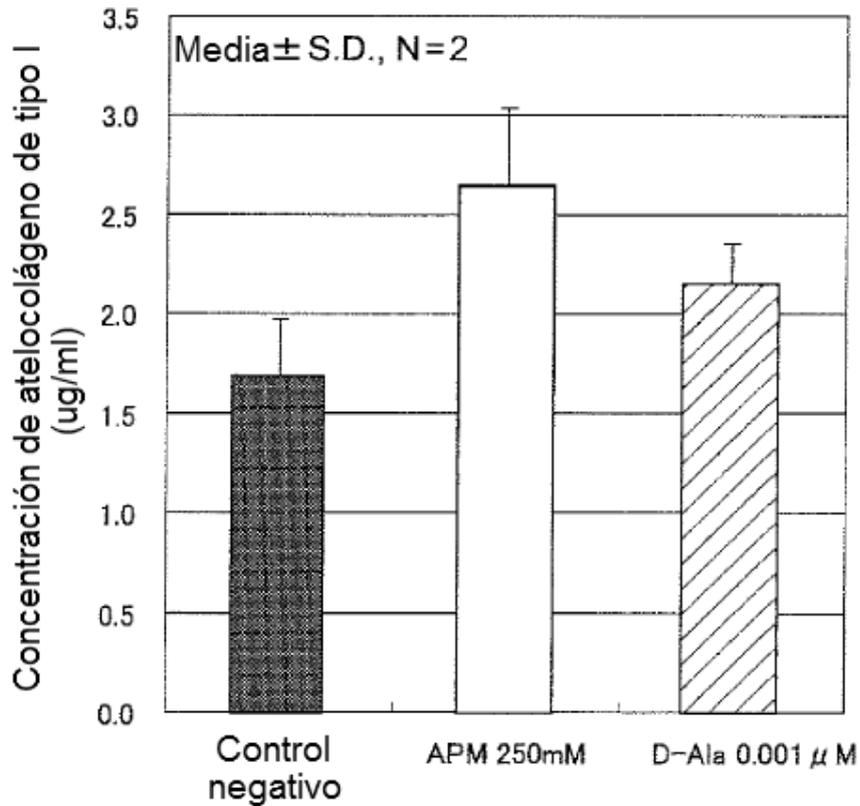


FIG.6