

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 547**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/485 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2016 PCT/KR2016/007985**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017 WO17213287**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2016 E 16904720 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3299385**

54 Título: **Proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante, y composición cosmética que contiene la misma como componente eficaz**

30 Prioridad:

08.06.2016 KR 20160071284

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

14.05.2020

73 Titular/es:

**NEXGEN BIOTECHNOLOGIES, INC. (50.0%)
2nd Floor B1 135 Gasan Digital 2-ro
Geumcheon-gu, Seoul 08504, KR y
LEE, SUN KYO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEE, SUN KYO;
RYU, HAN BONG;
LEE, SEONG RAN;
CHOI, JONG NAM;
CHOI, TAE WON;
KIM, TAE HYUN;
JEONG, TAE HWA y
KWON, HYEONG IL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 760 547 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

5 Proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante, y composición cosmética que contiene la misma como componente eficaz

Campo técnico

10 La presente invención se refiere a una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante y a una composición cosmética para regenerar la piel y mejorar las arrugas de la piel que comprende la misma como componente eficaz.

Técnica antecedente

15 La industria cosmética moderna se enfoca en el desarrollo y la aplicación de nuevos materiales a medida que se agotan las materias primas para cosméticos. Actualmente, el desarrollo de técnicas para tener nuevos materiales y el desarrollo de cosméticos con alto rendimiento se realizan continuamente en toda la industria cosmética. En particular, el factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) es uno de los materiales que llama la atención de los consumidores, ya que tiene un excelente efecto de regeneración de la piel, como la mejora de las arrugas y el blanqueamiento.

20 Después de llegar a la edad adulta (es decir, alrededor de 25 años), la piel humana experimenta una aparición de pigmentación, arrugas o similares y un progreso del fenómeno de envejecimiento de la piel a medida que se ralentiza el metabolismo corporal o la actividad de regeneración celular. El factor de crecimiento epidérmico humano con excelente efecto de regeneración de la piel se ha utilizado como agente terapéutico medicinal para la regeneración de la piel. Sin embargo, los estudios se realizan principalmente sobre el uso del factor de crecimiento epidérmico humano como materia prima de cosméticos funcionales para la prevención del envejecimiento, que tiene una actividad de recuperación de la actividad de regeneración de la piel disminuida y promueve el crecimiento de nuevas células cutáneas.

25 Al unirse a un receptor para un factor de crecimiento epidérmico presente en una superficie de una célula, el factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) induce una dimerización de un receptor para un factor de crecimiento epidérmico. Un receptor dimérico para un factor de crecimiento epidérmico activa la tirosina quinasa presente en el receptor para inducir un sistema de transducción de señal intracelular. Como resultado de esos procedimientos, se promueve la glicólisis y la síntesis de proteínas en una célula, lo que finalmente conduce al crecimiento celular.

30 El factor de crecimiento epidérmico, que juega un papel importante en la regeneración de la piel, disminuye de acuerdo con el progreso del envejecimiento, y una disminución en el factor de crecimiento epidérmico provoca una reducción en la proliferación y transferencia de las células cutáneas, y por lo tanto fenómenos como el envejecimiento de la piel, aumento de las arrugas y la elasticidad de la piel reducida se exhiben en consecuencia.

35 La toxina botulínica que se descubrió por primera vez a partir de *Clostridium botulinum* se usó inicialmente con fines médicos basándose en su efecto anestésico en una neurona motora. En particular, cuando una cantidad extrema de toxina botulínica se usa selectivamente para un área limitada, se demostró que los síntomas relacionados con el trastorno muscular o neuronal pueden tratarse. Por consiguiente, Allergan Inc., que es una compañía farmacéutica estadounidense, proporciona un producto comercial de toxina botulínica A de baja concentración con el nombre comercial de Botox. En Corea del Sur, un total de 4 tipos de toxina botulínica están disponibles comercialmente, es decir, Botox, Botulex (Corea del Sur), Meditoxin (Corea del Sur), Dysport (Europa) y BTXA (China). Desde la década de 1990, se sabe que Botox tiene el efecto de eliminar las arrugas de la piel, por lo que ahora se usa en todo el mundo con el propósito de eliminar las arrugas de la piel en el campo de la cirugía estética.

40 En el año 2002, Botox ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) como un agente para tratar líneas curvas entre las cejas, y su popularidad como agente de tratamiento cosmético continúa hasta el día de hoy. Para la toxina botulínica que es más popular como agente terapéutico para mejorar las arrugas de la piel en la industria cosmética, se utiliza un tratamiento de inyección. Sin embargo, la mayor desventaja radica en que el efecto del tratamiento se prolonga solo de 3 a 6 meses y es bastante costoso.

45 En la presente invención, con el fin de tener una actividad prolongada más eficaz de la toxina botulínica que tiene un excelente efecto de remoción de la piel en el campo de la cirugía plástica cosmética, se llevó a cabo el desarrollo de una nueva proteína con el fin de obtener un distinto efecto de regeneración de la piel, en particular. Como resultado, se confirmó que una nueva proteína de fusión con doble función, que se produce de acuerdo con la unión de un factor de crecimiento epidérmico humano con excelente efecto de regeneración de la piel, ha maximizado la mejora de la piel y ha acelerado el efecto de regeneración de la piel.

Mientras tanto, en la Publicación de Solicitud de Patente Coreana N.º 2015-0144735, se divulga una “composición que comprende material de relleno y toxina botulínica para mejorar las arrugas o el envejecimiento de la piel, o tratar el trastorno neuromuscular”. Además, en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º US 2015/0133379 y en la Publicación de Solicitud de Patente Coreana N.º 2015-0056022, se divulga una “composición cosmética para mejorar la piel que comprende proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico”. Sin embargo, no se ha hecho ninguna descripción para la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante y una composición cosmética para regenerar la piel y mejorar las arrugas de la piel que comprende la misma como componente eficaz de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Problemas técnicos a resolver

La presente invención ha sido concebida en vista de las circunstancias descritas anteriormente, y de acuerdo con la fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con una proteína de la toxina botulínica, los inventores de la presente invención produjeron una novedosa proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación celular y efecto antioxidante. Se confirmó que la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano tiene excelente proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante en comparación con el factor de crecimiento epidérmico humano, y la presente invención se completa en consecuencia.

Medios técnicos para resolver los problemas

Con el fin de resolver los problemas descritos anteriormente, la presente invención proporciona una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

La presente invención también proporciona un gen que codifica la proteína de fusión mencionada anteriormente. La presente invención también proporciona un vector recombinante que comprende el gen mencionado anteriormente.

La presente invención también proporciona una célula huésped transformada con el vector recombinante mencionado anteriormente.

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir en una célula huésped una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano que comprende sobreexpresar un gen que codifica una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano transformando una célula huésped con el vector recombinante mencionado anteriormente.

La presente invención también proporciona una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano que se prepara mediante el procedimiento mencionado anteriormente.

La presente invención también proporciona una composición cosmética para regenerar la piel y mejorar las arrugas de la piel que comprende, como componente eficaz, una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Efecto ventajoso de la invención

El procedimiento de producción en *E. coli* usando el gen optimizado por codones de *E. coli* que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano de la presente invención tiene una etapa de producción simplificada ya que las proteínas se expresan en forma de un cuerpo de inclusión en *E. coli* (*Escherichia coli*) y permite la producción a gran escala de proteínas. Además, dado que la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano producida por el procedimiento mencionado anteriormente tiene una excelente función de regenerar la piel y mejorar las arrugas de la piel, se espera que la proteína de fusión sea usada ventajosamente como materia prima de la cosmética funcional.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un dibujo esquemático que ilustra el procedimiento para preparar el plásmido recombinante (pET22b::BTALEGF) que incluye un gen que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano y la transformación de *E. coli* con el plásmido.

La Figura 2 muestra los resultados de determinar la expresión de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano en *E. coli* mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (Figura 2A), y el resultado de determinar el dominio de EGF usando un kit de detección de EGF para observar la presencia o ausencia de un factor de crecimiento epidérmico humano en la proteína de fusión (Figura 2B).
 M; marcador de tamaño, 1; lisado celular bruto antes de la inducción de la expresión, 2; lisado celular bruto después de la inducción de expresión, C; Grupo control EGF y T; muestra de prueba (proteína de fusión).

La Figura 3 es una imagen fotográfica en la que el efecto de proliferación de fibroblastos dérmicos después del tratamiento de fibroblastos dérmicos con la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano se muestra mediante tinción con cristal violeta.

La Figura 4 muestra el resultado que ilustra el efecto antioxidante de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano en el que el efecto antioxidante se determina en base a la prueba DPPH.

Mejor(es) modo(s) para llevar a cabo la invención

Para lograr el objeto de la presente invención, la presente invención proporciona una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación celular y efecto antioxidante que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

El alcance de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano de acuerdo con la presente invención incluye una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

La proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano de la presente invención consiste en la SEQ ID NO: 2, y puede ser una proteína novedosa que se produce por fusión entre la proteína de la toxina botulínica que consiste en 1 los 448 aminoácidos y la proteína del factor de crecimiento epidérmico humano que consiste en los 449 a 501 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos anterior.

La presente invención proporciona además un gen que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante. Este gen puede consistir en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 optimizada con codones de *E. coli*, pero sin limitarse a los mismos.

El gen que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante de la presente invención puede incluir una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. Además, los homólogos de la secuencia de nucleótidos también están dentro del ámbito de la presente invención. Específicamente, el gen descrito anteriormente puede comprender una secuencia de nucleótidos que tiene preferentemente al menos 70%, más preferentemente al menos 80%, aún más preferentemente al menos 90%, y lo más preferentemente al menos 95% de homología con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. El “% de homología de secuencia” para un determinado polinucleótido se identifica comparando una región comparativa con dos secuencias que están alineadas de manera óptima. A este respecto, una parte del polinucleótido en la región comparativa puede comprender una adición o una eliminación (es decir, un espacio) en comparación con una secuencia de referencia (sin ninguna adición o eliminación) en relación con la alineación optimizada de las dos secuencias.

“Optimización por codones” significa una modificación del codón de un polinucleótido que codifica una proteína con un codón que se usa primero que otros en un organismo específico de modo que la proteína codificada pueda expresarse más eficientemente en el mismo. Debido a que la mayoría de los aminoácidos están descritos por varios codones que se denominan “sinónimo” o “codón sinónimo”, los códigos genéticos tienen degeneración. Sin embargo, el uso de codones por parte de un organismo específico no es aleatorio, y está sesgado a tripletes de codones específicos. Tal sesgo de uso de codones puede ser incluso mayor en relación con un determinado gen, un gen con función común u origen ancestro, proteína expresada a alto nivel frente a proteínas con bajo número de copias, o una región de codificación de proteínas grupales de un genoma de un organismo. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 de la presente invención es una secuencia que ha sido optimizada para el codón de *E. coli* de modo que el gen que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano se pueda expresar bien en *E. coli*.

La presente invención también proporciona un vector recombinante que comprende el gen descrito anteriormente, y una célula huésped transformada con el vector recombinante.

El término “recombinante” indica una célula que replica un nucleótido heterogéneo o expresa dicho nucleótido, o un péptido, un péptido heterogéneo o una proteína codificada por un nucleótido heterogéneo. La célula recombinante puede expresar un gen o un fragmento de gen en forma de sentido o antisentido, que no se encuentran en el estado natural de la célula. Además, una célula recombinante puede expresar un gen que se

encuentra en estado natural, siempre que dicho gen sea modificado y reintroducido en la célula por un medio artificial.

De acuerdo con la presente invención, el gen que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano se puede insertar en un vector de expresión recombinante. El término "vector de expresión recombinante" significa plásmido bacteriano, fago, plásmido de levadura, virus de células vegetales, virus de células de mamífero u otro vector. Cualquier plásmido y vector se puede usar generalmente si se puede replicar y se estabiliza en un huésped. Las características importantes del vector de expresión incluyen que comprende un origen de replicación, un promotor, un gen marcador y un elemento de control de traducción.

El vector de expresión que comprende la secuencia génica que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano y una señal apropiada para regular la transcripción/traducción se puede construir de acuerdo con un procedimiento que es bien conocido por un experto en la técnica. El procedimiento incluye una técnica de ADN recombinante *in vitro*, una técnica de síntesis de ADN y una técnica recombinante *in vivo*. Para inducir la síntesis de ARNm, la secuencia de ADN se puede unir eficazmente a un promotor adecuado presente en el vector de expresión. Además, el vector de expresión puede comprender un sitio de unión a ribosomas como un sitio de inicio de traducción y un terminador de transcripción.

El vector recombinante de acuerdo con una realización de la presente invención se prepara mediante fusión en marco de 5' terminal (sitio de enzima de restricción *NdeI*) y 3' terminal (sitio de enzima de restricción *XhoI*) del gen que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano (SEQ ID NO: 1) al vector pET22b, y es un vector caracterizado porque puede producir la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano basado en la expresión eficaz del gen antes mencionado con una ayuda del promotor lac (promotor *lac*) y del represor lacI (represor *lacI*).

Para una célula huésped que tiene la capacidad de tener una clonación y expresión estable y continua del vector de la presente invención, se puede usar cualquier célula huésped conocida en la técnica pertinente. Los ejemplos de las células procariotas incluyen la cepa *Bacillus* sp. que incluye *E. coli* Rosetta, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* y similares, y bacterias y cepas intestinales que incluyen *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y varias *Pseudomonas* sp. etc.

Además, cuando una célula eucariota se transforma con el vector de la presente invención, la levadura (*Saccharomyce cerevisiae*), una célula de insecto, una célula humana (por ejemplo, línea celular CHO (ovario de hámster chino), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN, y línea celular MDCK), una célula vegetal, y similares se pueden usar como una célula huésped.

La célula huésped transformada con el vector recombinante de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS, pero sin limitarse a la misma.

Cuando una célula huésped es una célula procariota, el suministro del vector recombinante de la presente invención en una célula huésped se puede llevar a cabo mediante el procedimiento $CaCl_2$, el procedimiento de Hanahan (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580 (1983)) o un procedimiento de electroporación, y similares. Además, cuando una célula huésped es una célula eucariota, el vector se puede introducir en una célula huésped mediante un procedimiento de microinyección, un procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, un procedimiento de electroporación, un procedimiento de transfección mediada por liposomas, un procedimiento de tratamiento con DEAE-dextrano o un procedimiento de bombardeo genético y similares.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir en una célula huésped una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano que comprende sobreexpresar un gen que codifica una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano transformando una célula huésped con el vector recombinante descrito anteriormente.

Con respecto al procedimiento de acuerdo con una realización de la presente invención, la célula huésped puede ser preferentemente *E. coli*, y más preferentemente *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS, pero sin limitarse a los mismos.

La presente invención proporciona además una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano que se prepara mediante el procedimiento mencionado anteriormente.

La presente invención proporciona además una composición cosmética para regenerar la piel y mejorar las arrugas de la piel que comprende, como componente eficaz, una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En la composición cosmética, de acuerdo con una realización de la presente invención, el contenido de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano puede ser del 0,000002 al 0,02% en

peso con respecto al peso total de la composición cosmética, pero sin limitarse al mismo.

En la composición cosmética de la presente invención, los componentes que se usan usualmente para una composición cosmética se incluyen además de los componentes eficaces que se describen anteriormente.
 5 Ejemplos de los mismos incluyen un material lipídico, un solvente orgánico, un agente de disolución, un agente de condensación, un agente gelificante, un agente suavizante, un antioxidante, un agente de suspensión, un estabilizador, un agente espumante, un aroma, un agente tensioactivo, agua, un emulsionante iónico o no iónico, una carga, un agente secuestrante de iones metálicos, un agente quelante, un conservante, una vitamina, un agente bloqueante, un agente humectante, aceite esencial, un tinte, un pigmento, un agente activador hidrófilo o lipófilo, un agente auxiliar común como la vesícula lipídica y un vehículo.

La composición de la presente invención se puede preparar en cualquier formulación que generalmente se prepara en la técnica pertinente. Por ejemplo, la composición se puede formular en una solución, una suspensión, una emulsión, una pasta, un gel, una crema, una loción, un polvo, un aceite, una base en polvo, una base en emulsión, una base de cera, un aerosol, o similares, pero no se limitan a los mismos. Más específicamente, la composición se puede formular en una piel, un suavizante de la piel, un tónico para la piel, un astringente, una loción, una loción de leche, una loción humectante, una loción nutricional, una crema para masajes, una crema para los ojos, una crema humectante, una crema para manos, una esencia, una esencia nutricional, un paquete, una espuma limpiadora, un agua limpiadora, una loción limpiadora, una crema limpiadora, una loción corporal, un limpiador corporal, un jabón, un polvo o similares.

En un caso en el que la composición cosmética de la presente invención tenga un tipo de formulación de pasta, crema o gel, es posible usar, como componente portador, aceite animal, aceite vegetal, cera, parafina, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco u óxido de zinc.

En un caso en el que la composición cosmética de la presente invención tenga un tipo de formulación de polvo o aerosol, es posible usar, como componente portador, lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o polvo de poliamida. En particular, en un caso en el que la composición cosmética es un aerosol, se puede incluir adicionalmente un propelente tal como clorofluorohidrocarburo, propano/butano o dimetiléter.

En un caso en el que la composición cosmética de la presente invención tenga un tipo de formulación de solución o emulsión, se usa un solvente, un agente de disolución o un emulsionante como componente portador, y ejemplos de los mismos incluyen isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3-butilglicol, éster alifático de glicerol, polietilenglicol y éster de ácido graso de sorbitán.

En un caso en el que la composición cosmética de la presente invención tenga un tipo de suspensión de formulación, es posible usar, como componente portador, un diluyente en fase líquida tal como agua, etanol o propilenglicol, un agente de suspensión tales como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de polioxietileno sorbitol, o éster de polioxietilensorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar o tragacanto.

A continuación, la presente invención se explica con mayor detalle a la vista de los Ejemplos. Sin embargo, es evidente que los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente a modo de ejemplo de la presente invención y de ninguna manera la presente invención se limita a los siguientes ejemplos.

45 **Ejemplos**

Ejemplo 1. Preparación de un vector de expresión recombinante y microorganismo recombinante transformado para producir proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano

50 El gen optimizado que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano, el vector de expresión recombinante y el microorganismo recombinante transformado se prepararon de acuerdo con los siguientes procedimientos.

Al usar como plantilla los genes que codifican la proteína de la toxina botulínica (en lo sucesivo, BTAL) o el factor de crecimiento epidérmico humano (en lo sucesivo, hEGF) utilizado como proteína asociada, se preparó y sintetizó el fragmento del gen (SEQ ID NO: 1) que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano que consta de 501 aminoácidos y se ha optimizado para la expresión en un microorganismo huésped.

60 Con el fin de sintetizar el gen que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano (SEQ ID NO: 2) que tiene el factor de crecimiento epidérmico humano unido a la terminal carboxi (C-terminal) de la toxina botulínica, el nucleótido de 1344 pb (es decir, del nucleótido 1 al 1344 de la SEQ ID NO: 1) que codifica la toxina botulínica, que se ha optimizado para *E. coli*, se sintetizó usando un cebador directo 1 (5'-AAGGAGATATACATATGCCGTTTCGTTAAC-3', SEQ ID NO: 3) y un cebador inverso 1 (5'-GTCTGAGTTTTTGTGTTAAC-3', SEQ ID NO: 4). Además, se sintetizaron nucleótidos de 159 pb (es decir, del

nucleótido 1345 al 1503 de la SEQ ID NO: 1) que codifican el factor de crecimiento epidérmico humano, que se ha optimizado para *E. coli*, usando un cebador directo 2 (5'-GTTACAACAAAACTCAGAC-3', SEQ ID NO: 5) y un cebador inverso 2 (5'-GTGCTCGAGGCGCAACTCCC-3', SEQ ID NO: 6). Al tener cada uno de los genes que codifican la proteína de la toxina botulínica o el factor de crecimiento epidérmico humano, que se han sintetizado mediante el procedimiento anterior, como plantilla y también mediante el uso de un cebador directo 1 (SEQ ID NO: 3) y un cebador inverso 2 (SEQ ID NO: 6), un gen que consta de 1503 nucleótidos que codifican una proteína de fusión en la que el factor de crecimiento epidérmico humano se une a la terminal C de la toxina botulínica se obtuvo finalmente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El fragmento de gen y el plásmido recombinante mencionados anteriormente se digirieron con las mismas enzimas de restricción (*Nde*I 5' terminal y *Xho*I 3' terminal) seguido de inserción y, de este modo, se preparó el plásmido recombinante (pET22b::BTALEGF) que se muestra en la Figura 1. Posteriormente, *E. coli* TOP10 se transformó con el plásmido recombinante preparado para obtener una gran cantidad de la construcción génica del microorganismo huésped.

Después de eso, *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS (Novagen, Alemania) se transformó con el plásmido recombinante preparado para producir un microorganismo recombinante para producir una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano.

Ejemplo 2. Inducción de expresión, aislamiento y purificación de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano

La *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS preparada en el Ejemplo 1 se cultivó en medio LB de 1 l (10% de triptófano, 10% de cloruro de sodio y 5% de extracto de levadura) o medio BSB (1% de triptófano, 0,5% de extracto de levadura, 1% de glucosa y 0,1% de HEPES (pH 7,0), fabricado por Nexgen Biotechnologies, Inc.) hasta tener $OD_{600} = 0,6$ a 0,8 para el cultivo por lotes, u $OD_{600} = 15$ a 20 para el cultivo continuo usando un aparato de fermentación de 20 l. Después de eso, al agregar IPTG de 1 a 5 mM o 2% de lactosa (ambos en concentración final) a cada medio de cultivo celular, se indujo la expresión de *E. coli* recombinante. Después de la inducción de la expresión génica, las células se cultivaron adicionalmente durante 3 a 4 horas, y luego se recogieron por centrifugación. Las células recogidas se suspendieron suficientemente en una solución tampón (solución salina tamponada con fosfato, 8 g de cloruro de sodio, 0,2 g de cloruro de potasio, 1,44 g de hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) y 0,24 g de fosfato potásico dihidrogenado (KH_2PO_4)/l, pH 7,4) y se interrumpió utilizando un homogeneizador de células ultrasónicas. Como resultado, se separó una solución que contenía proteínas intracelulares.

Mediante el uso de la solución separada anterior como una muestra, se examinó la expresión de la proteína mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 15%. Como resultado, se confirmó la expresión de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano a partir de lisado celular bruto en el que la inducción de expresión se ha llevado a cabo con IPTG o lactosa (Figura 2A).

Con el fin de determinar la presencia o ausencia del factor de crecimiento epidérmico humano en la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano, se usó un kit de detección de EGF (fabricado por Nexgen Biotechnologies, Inc., Corea del Sur). Como resultado, se confirmó la presencia del factor de crecimiento epidérmico humano en la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano (Figura 2B).

Con el fin de aislar y purificar la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano cuya expresión se ha confirmado anteriormente, el cuerpo de inclusión se solubilizó usando una solución tampón solubilizante (urea 5 M, pH 11), y luego se sometió a un procedimiento de replegamiento utilizando filtración ultrafina (membrana de filtración fina de 0,45 μ m y membrana de filtración ultrafina de 1K). Por consiguiente, la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano se aisló finalmente usando una solución tampón de almacenamiento (PBS).

Ejemplo 3. Medición de la actividad de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano-efecto de proliferación de fibroblastos dérmicos

Con la selección de una muestra a partir de la cual se ha confirmado la presencia de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano aislada y purificada como se describe en el Ejemplo 2, se midió una actividad de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano.

Después de cultivar fibroblastos dérmicos (fibroblastos dérmicos humanos adultos, célula HDFa), las células se trataron con la proteína de fusión en una concentración de 0, 0,02 ppm o 0,2 ppm, seguido de cultivo durante 3 días a 37 °C. Posteriormente, la proliferación del fibroblasto dérmico se determinó en base a la tinción con cristal violeta.

Como resultado, se encontró que, en comparación con un grupo de control sin tratamiento (0 ppm), se obtiene un efecto de proliferación de fibroblastos dérmicos más favorable a medida que aumenta la concentración de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano (0,02 a 0,2 ppm) (Figura 3). Además, en comparación con cada grupo de tratamiento de proteína del factor de crecimiento epidérmico humano que no se ha fusionado con ninguna proteína de la toxina botulínica, se observó un mayor efecto de proliferación celular con la proteína de fusión. En base al resultado anterior, se confirmó el efecto sinérgico de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano.

Ejemplo 4. Medición de la actividad antioxidante de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano

Con el fin de medir el efecto antioxidante de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano, se llevó a cabo el análisis DPPH (1, 1-difenil-2-picrilhidrazilo) como uno de los procedimientos para medir el efecto de eliminación de radicales libres. Dicho reactivo está presente como un radical libre relativamente estable, y se usa principalmente para la determinación basada en un tubo de ensayo de una actividad de eliminación de radicales libres.

Para el análisis DPPH, se usó ácido L-ascórbico como control positivo. El procedimiento de prueba es el siguiente. Cada uno del ácido L-ascórbico, la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano y la proteína del factor de crecimiento epidérmico humano se preparó en una concentración de 1 μ M, y DPPH se preparó para tener una concentración final de 200 μ M. Después de mezclar cada una de las proteínas anteriores y DPPH en una proporción de 1:1, la mezcla se dejó en reposo a 37 °C durante 30 minutos. Después de eso, se midió la absorbancia a 520 nm usando un lector ELISA. La actividad de eliminación de radicales libres (%) se calculó en base a la siguiente ecuación 1, y los resultados se muestran en la Figura 4.

$$\text{Actividad de eliminación de radicales libres (\%)} = 100 - ((B/A) * 100) \quad (\text{Ecuación 1})$$

[A: absorbancia del grupo control en el que la muestra no se sometió a tratamiento,
B: absorbancia del grupo de prueba en el que la muestra se sometió a un tratamiento]

Como resultado, la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano mostró la actividad de eliminación de radicales libres que es aproximadamente 1,5 veces mayor que el grupo de control de ácido L-ascórbico. Incluso en comparación con la proteína del factor de crecimiento epidérmico humano que no se fusionó con ninguna toxina botulínica, mostró una actividad de eliminación de radicales libres que es aproximadamente 2,5 veces mayor que esa (Figura 4). Como tal, se descubrió que la proteína de fusión de la presente invención tiene una actividad antioxidante aún mayor debido a la toxina botulínica, y estos resultados indican que la proteína de fusión puede tener un efecto antienvjecimiento para la piel en función de su efecto antioxidante.

Ejemplo de prueba 1. Mejora de las arrugas de la piel, efecto de mantenimiento de la elasticidad de la piel y prueba sensorial de irritación de la piel.

Mediante el uso de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano que se ha aislado y purificado como se describe en el Ejemplo 2 como un componente eficaz, las composiciones cosméticas de los Ejemplos de preparación 1, 2, 3 y 4 y los Ejemplos comparativos 1, 2, 3 y 4 se prepararon y utilizaron para una prueba sensorial (ver Tablas 1, 3, 5 y 7).

Específicamente, para confirmar cualquier mejora de arrugas, un total de 30 hombres y mujeres con edad de 30 años o más pero menores de 60 (10 con 30 años, 10 con 40 años, y 10 con 50 y 60 años) como sujetos se les permitió aplicar, una vez al día durante 2 semanas seguidas, la composición del ejemplo comparativo (es decir, el grupo de control) alrededor del área de los ojos en el lado izquierdo de la cara o alrededor del lado izquierdo de los labios en los que se encuentran muchas arrugas, o la composición del ejemplo de preparación (es decir, grupo de prueba) alrededor del área de los ojos en el lado derecho de una cara o alrededor del lado derecho de los labios. La evaluación se realizó en función del nivel de reducción de arrugas alrededor de los ojos o labios. También para el elemento de irritación de la piel, se realizó una prueba sensorial de acuerdo con el mismo procedimiento descrito anteriormente en términos de picazón, sensación de hormigueo y un fenómeno de eritema. La evaluación se realizó en base a criterios de evaluación de cinco puntos, es decir, muy excelente (5 puntos), excelente (4 puntos), moderado (3 puntos), pobre (2 puntos) y muy pobre (1 punto). Mientras tanto, si el resultado de la prueba sensorial no se puede describir con un número entero, se describió con un decimal. Los resultados se muestran en las Tablas 2, 4, 6 y 8.

<Ejemplo de preparación 1 y Ejemplo comparativo 1>

Mediante la adición de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano como un componente eficaz y que tiene los componentes y el contenido que se describen en la siguiente Tabla 1,

se preparó una piel del Ejemplo de preparación 1.

Además, sin agregar la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano como un componente eficaz pero que tiene los componentes y el contenido que se describen en la siguiente Tabla 1, se preparó una piel del Ejemplo comparativo 1.

Tabla 1

Composición cutánea		
Componente	Ejemplo de preparación 1 (% en peso)	Ejemplo comparativo 1 (% en peso)
Proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano	0,002	-
Solución de aminoácidos	0,1	0,1
Mezcla mineral	0,0007	0,0007
Agua purificada	c.s.	c.s.

Los resultados de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 1 anterior y el Ejemplo comparativo 1 son los que se muestran en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

Resultado de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 1 y el Ejemplo comparativo 1				
No.	Prueba sensorial respecto del efecto de mejora de las arrugas e irritación de la piel			
	Mejora de las arrugas		Irritación de la piel	
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	
30 años	1	5	4	4
	2	4	3	4
	3	4	5	4
	4	5	5	4
	5	5	3	3
	6	4	4	4
	7	5	3	4
	8	5	4	4
	9	4	3	3
	10	4	3	3
40 años	11	5	3	4
	12	4	2	4
	13	4	2	4
	14	4	3	4
	15	5	4	4,5
	16	5	3	4,5
	17	4	3	4
	18	5	3,5	4
	19	4	3,5	4
	20	4	3	5
50 años y 60 años	21	4	3,5	4
	22	5	3	5

Resultado de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 1 y el Ejemplo comparativo 1				
No.	Prueba sensorial respecto del efecto de mejora de las arrugas e irritación de la piel			
	Mejora de las arrugas		Irritación de la piel	
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	
23	4	3	4	
24	4,5	3,5	4	
25	4	3	4,5	
26	4	3	5	
27	5	3	4,5	
28	4	3	5	
29	3,5	3,5	4	
30	4	3	4	
Promedio	4,4	3,3	4,1	

<Ejemplo de preparación 2 y Ejemplo comparativo 2>

Mediante la adición de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano como un componente eficaz y con los componentes y el contenido que se describen en la siguiente Tabla 3, se preparó una esencia del Ejemplo de preparación 2.

Además, sin añadir la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano como un componente eficaz pero que tiene los componentes y el contenido que se describen en la siguiente Tabla 3, se preparó una esencia del Ejemplo comparativo 2.

Tabla 3

Composición de esencia		
Componente	Ejemplo de preparación 2 (% en peso)	Ejemplo comparativo 2 (% en peso)
Proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano	0,002	-
Solución de aminoácidos	0,05	0,05
Mezcla mineral	0,0007	0,0007
Glicerol	5	5
1,3-Butilenglicol	10	10
Carbopol 940	0,3	0,3
Agua purificada	c.s.	c.s.

Los resultados de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 2 anterior y el Ejemplo comparativo 2 son los que se muestran en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4

Resultado de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 2 y el Ejemplo comparativo 2				
No.	Prueba sensorial respecto del efecto de mejora de las arrugas e irritación de la piel			
	Mejora de las arrugas		Irritación de la piel	
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	
30 años	1	5	4	4
	2	5	4	4
	3	3	5	3
	4	5	3	4
	5	5	3	3
	6	5	4	5
	7	5	3	4
	8	5	3	5
	9	4	3	3
	10	5	4	3
40 años	11	5	3	3
	12	5	3	4
	13	4	2	4
	14	5	3	5
	15	5	4	4,5
	16	5	3	4,5
	17	4	3	4
	18	5	3	5
	19	4	4	4
	20	4	3	5
50 años y 60 años	21	5	3,5	4
	22	5	3	5
	23	4	4	5
	24	5	3,5	4
	25	4	3	5
	26	5	3	5
	27	5	3	4,5
	28	4	4	5
	29	3,5	3	4
	30	5	3	4
	Promedio	4,6	3,3	4,2

<Ejemplo de preparación 3 y Ejemplo comparativo 3>

Mediante la adición de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano como un componente eficaz y que tiene los componentes y el contenido que se describen en la siguiente Tabla 5, se preparó una loción del Ejemplo de preparación 3.

Además, sin agregar la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano como un componente eficaz, pero con los componentes y el contenido que se describen en la siguiente Tabla 5, se preparó una loción del Ejemplo comparativo 3.

5

Tabla 5

Composición de loción		
Componente	Ejemplo de preparación 3 (% en peso)	Ejemplo comparativo 3 (% en peso)
Proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano	0,001	-
Solución de aminoácidos	0,05	0,05
Mezcla mineral	0,0007	0,0007
Glicerol	3	3
1,3-Butilenglicol	10	10
Aceite mineral	5	5
Alcohol cetílico	2	2
Goma de xantano	0,5	0,5
Agua purificada	c.s.	c.s.

25

Los resultados de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 3 anterior y el Ejemplo comparativo 3 son los que se muestran en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6

Resultado de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 3 y el Ejemplo comparativo 3				
No.		Prueba sensorial respecto del efecto de mejora de las arrugas e irritación de la piel		
		Mejora de las arrugas		Irritación de la piel
		Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación
30 años	1	4,5	3	5
	2	4	4	5
	3	3	4	3
	4	4	5	5
	5	4	3	5
	6	3	3	4
	7	5	4	4
	8	5	3	5
	9	5	3	4
	10	4	4	4
40 años	11	5	4	5
	12	5	3	4
	13	3	2	4
	14	4	4	4
	15	5	4	4
	16	4	3	4
	17	4	3,5	3
	18	4	3,5	3

65

Resultado de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 3 y el Ejemplo comparativo 3				
No.	Prueba sensorial respecto del efecto de mejora de las arrugas e irritación de la piel			
	Mejora de las arrugas		Irritación de la piel	
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	
19	4	3,5	3	
20	3	3	4	
50 años y 60 años	21	3	3	4
	22	4	3,5	5
	23	4	3	4
	24	4	3,5	5
	25	3	3,5	5
	26	3	3	5
	27	4	3	5
	28	4	3	5
	29	4	3	4
	30	4	3	4
Promedio	3,9	3,3	4,2	

<Ejemplo de preparación 4 y Ejemplo comparativo 4>

Mediante la adición de la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano como un componente eficaz y con los componentes y el contenido que se describen en la siguiente Tabla 7, se preparó una crema del Ejemplo de preparación 4.

Además, sin agregar la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano como un componente eficaz pero que tiene los componentes y el contenido que se describen en la siguiente Tabla 7, se preparó una crema del Ejemplo Comparativo 4.

Tabla 7

Composición de crema		
Componente	Ejemplo de preparación 4 (% en peso)	Ejemplo comparativo 4 (% en peso)
Proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano	0,001	-
Solución de aminoácidos	0,05	0,05
Mezcla mineral	0,0007	0,0007
Glicerol	2	2
Aceite mineral	10	10
Cera de emulsión de oliva	3	3
Alcohol cetílico	2	2
Agua purificada	c.s.	c.s.

Los resultados de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 4 anterior y el Ejemplo comparativo 4 son los que se muestran en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8

Resultado de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 4 y el Ejemplo comparativo 4				
No.	Prueba sensorial respecto del efecto de mejora de las arrugas e irritación de la piel			
	Mejora de las arrugas		Irritación de la piel	
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	
30 años	1	4	4	4
	2	3	3,5	4
	3	3	3	3
	4	3	4	4
	5	3,5	3	4
	6	4	3,5	4
	7	4	3,5	4
	8	4	3,5	5
	9	4	4	5
	10	3,5	4	3
40 años	11	4	3,5	4
	12	4,5	4	5
	13	4	3	5
	14	3,5	4	4
	15	4	3,5	5
	16	4	3,5	4
	17	4	4	3
	18	3,5	3	3
	19	4	3	3
	20	4	3,5	4
50 años y 60 años	21	4	3,5	5
	22	3,5	3	5
	23	5	4	4
	24	4	3,5	5
	25	4	3,5	5
	26	3,5	3	5
	27	3	3,5	4
	28	3	3	4
	29	3,5	3	4
	30	4	3	4
	Promedio	3,7	3,4	4,1

A partir de los resultados de las pruebas sensoriales proporcionados anteriormente, se encontró que, en comparación con los ejemplos Comparativos, los ejemplos de Preparación 1, 2, 3 y 4 en los que la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano de la presente invención es contenida como un componente eficaz tiene el efecto de mejorar las arrugas de la piel.

Listado de secuencias

<110> Nexgen Biotechnologies, Inc.

5 <120> Proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante y composición cosmética para mejorar las arrugas y promover la reproducción de la piel que comprende la misma como componente eficaz

10 <130> PCT1625

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

15 <210> 1

<211> 1503

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> BTAL-EGF

<400> 1

25	atgccgttcg ttaacaaaca gttcaactac aaagaccggt ttaacgggtg tgacatcgcg	60
	tacatcaaaa tcccgaacgt tggtcagatg cagccgggta aagcgttcaa aatccacaac	120
	aaaatctggg ttatcccgga acgtgacacc ttcaccaacc cggaagaagg tgacctgaac	180
30	ccgccgccgg aagcgaaaca ggttccggtt tcttactacg actctaccta cctgtctacc	240
	gacaacgaaa aagacaacta cctgaaaggt gttaccaaac tgttcgaacg tatctactct	300
35	accgacctgg gtcgtatgct gctgacctct atcgttcgtg gtatcccgtt ctgggggtgg	360
	tctaccatcg acaccgaact gaaagttatc gacaccaact gcatcaacgt tatccagccg	420
	gacggttctt accgttctga agaactgaac ctggttatca tcgggtccgtc tgcggacatc	480
40	atccagttcg aatgcaaata tttcgggtcac gaagttctga acctgaccgg taacgggttac	540
	ggttctaccc agtacatccg tttctctccg gacttcacct tcggtttcga agaactctctg	600
45	gaagttgaca ccaaccgct gctgggtgcg ggtaaattcg cgaccgacc ggcggttacc	660
	ctggcgcacg aactgatcca cgcgggtcac cgtctgtacg gtatcgcgat caaccggaac	720
	cgtgttttca aagttaacac caacgcgtac tacgaaatgt ctgggtctgga agtttctttc	780
50	gaagaactgc gtaccttcgg tggtcacgac gcgaaattca tcgactctct gcaggaaaac	840
	gaattccgtc tgtactacta caacaaattc aaagacatcg cgtctaccct gaacaaagcg	900
	aaatctatcg ttggtaccac cgcgtctctg cagtacatga aaaacgtttt caaagaaaaa	960
55	tacctgctgt ctgaagacac ctctggtaaa ttctctgttg acaaactgaa attcgacaaa	1020
	ctgtacaaaa tgctgaccga aatctacacc gaagacaact tcggttaaatt cttcaaagtt	1080
60	ctgaaccgta aaacctacct gaacttcgac aaagcggttt tcaaaatcaa catcgttccg	1140
	aaagttaact acaccatcta cgacggtttc aacctgcgta acaccaacct ggcggcgaac	1200

65

ES 2 760 547 T3

ttcaacggtc agaacaccga aatcaacaac atgaacttca ccaaactgaa aaacttcacc 1260
 ggtctgttcg aattctacaa actgctgtgc gttcgtggta tcatcacctc taaaaccaa 1320
 5 tctctggaca aaggttacaa caaaaactca gactctgagt gccactgtc tcacgacggc 1380
 tactgccttc acgacggagt ctgcatgtac atcgaggctt tggataagta cgcttgtaat 1440
 10 tgcgtcgttg gttacattgg agagcgctgc caataccgtg acttaaaatg gtgggagttg 1500
 cgc 1503

<210> 2
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> BTAL-EGF
 20 <400> 2

25	Met	Pro	Phe	Val	Asn	Lys	Gln	Phe	Asn	Tyr	Lys	Asp	Pro	Val	Asn	Gly
	1				5					10					15	
30	Val	Asp	Ile	Ala	Tyr	Ile	Lys	Ile	Pro	Asn	Val	Gly	Gln	Met	Gln	Pro
				20					25					30		
35	Val	Lys	Ala	Phe	Lys	Ile	His	Asn	Lys	Ile	Trp	Val	Ile	Pro	Glu	Arg
			35					40					45			
40	Asp	Thr	Phe	Thr	Asn	Pro	Glu	Glu	Gly	Asp	Leu	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu
		50					55					60				
45	Ala	Lys	Gln	Val	Pro	Val	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Thr
	65					70					75					80
50	Asp	Asn	Glu	Lys	Asp	Asn	Tyr	Leu	Lys	Gly	Val	Thr	Lys	Leu	Phe	Glu
					85					90					95	
55	Arg	Ile	Tyr	Ser	Thr	Asp	Leu	Gly	Arg	Met	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Val
				100					105					110		
60	Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Trp	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Asp	Thr	Glu	Leu	Lys
			115					120					125			
65	Val	Ile	Asp	Thr	Asn	Cys	Ile	Asn	Val	Ile	Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr
		130					135					140				
70	Arg	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Val	Ile	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ile
	145					150					155					160
75	Ile	Gln	Phe	Glu	Cys	Lys	Ser	Phe	Gly	His	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Thr
					165					170					175	
80	Arg	Asn	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Tyr	Ile	Arg	Phe	Ser	Pro	Asp	Phe
				180					185					190		
85	Thr	Phe	Gly	Phe	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Asn	Pro	Leu	Leu
			195					200					205			
90	Gly	Ala	Gly	Lys	Phe	Ala	Thr	Asp	Pro	Ala	Val	Thr	Leu	Ala	His	Glu

ES 2 760 547 T3

	210		215		220												
5	Leu 225	Ile	His	Ala	Gly	His 230	Arg	Leu	Tyr	Gly	Ile 235	Ala	Ile	Asn	Pro	Asn 240	
	Arg	Val	Phe	Lys	Val 245	Asn	Thr	Asn	Ala	Tyr 250	Tyr	Glu	Met	Ser	Gly	Leu 255	
10	Glu	Val	Ser	Phe 260	Glu	Glu	Leu	Arg	Thr 265	Phe	Gly	Gly	His	Asp 270	Ala	Lys	
15	Phe	Ile	Asp 275	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn 280	Glu	Phe	Arg	Leu	Tyr 285	Tyr	Tyr	Asn	
	Lys	Phe	Lys	Asp	Ile	Ala	Ser	Thr 295	Leu	Asn	Lys	Ala 300	Lys	Ser	Ile	Val	
20	Gly 305	Thr	Thr	Ala	Ser	Leu 310	Gln	Tyr	Met	Lys	Asn 315	Val	Phe	Lys	Glu	Lys 320	
25	Tyr	Leu	Leu	Ser	Glu 325	Asp	Thr	Ser	Gly	Lys 330	Phe	Ser	Val	Asp	Lys	Leu 335	
	Lys	Phe	Asp	Lys 340	Leu	Tyr	Lys	Met 345	Leu	Thr	Glu	Ile	Tyr	Thr 350	Glu	Asp	
30	Asn	Phe	Val 355	Lys	Phe	Phe	Lys	Val 360	Leu	Asn	Arg	Lys	Thr 365	Tyr	Leu	Asn	
35	Phe	Asp 370	Lys	Ala	Val	Phe	Lys 375	Ile	Asn	Ile	Val	Pro 380	Lys	Val	Asn	Tyr	
	Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe 390	Asn	Leu	Arg	Asn	Thr 395	Asn	Leu	Ala	Ala	Asn 400	
40	Phe	Asn	Gly	Gln	Asn 405	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn 410	Met	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu 415	
45	Lys	Asn	Phe	Thr 420	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe 425	Tyr	Lys	Leu	Leu	Cys 430	Val	Arg	
	Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys 440	Ser	Leu	Asp	Lys	Gly 445	Tyr	Asn	Lys	
50	Asn	Ser 450	Asp	Ser	Glu	Cys	Pro 455	Leu	Ser	His	Asp	Gly 460	Tyr	Cys	Leu	His	
55	Asp 465	Gly	Val	Cys	Met	Tyr 470	Ile	Glu	Ala	Leu	Asp 475	Lys	Tyr	Ala	Cys	Asn 480	
	Cys	Val	Val	Gly	Tyr 485	Ile	Gly	Glu	Arg	Cys 490	Gln	Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys 495	
60	Trp	Trp	Glu	Leu	Arg 500												

<210> 3
 <211> 29
 <212> ADN

ES 2 760 547 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador

5

<400> 3
aaggagatat acatatgccg ttcgtaac 29

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> cebador

15

<400> 4
gtctgagttt ttgtgtaac 20

20

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<223> cebador

<400> 5
gttacaaca aactcagac 20

30

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35

<220>
<223> cebador

<400> 6
gtgctcgagg cgcaactccc 20

40

REIVINDICACIONES

- 5
1. Una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
2. Un gen que codifica la proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con aumento de la proliferación de las células cutáneas y efecto antioxidante según la reivindicación 1.
- 10 3. El gen de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** el gen consiste en la secuencia de nucleótidos optimizada por codones de *E. coli* (*Escherichia coli*) de la SEQ ID NO: 1.
4. Un vector recombinante que comprende el gen según la reivindicación 2 o 3.
- 15 5. Una célula huésped transformada con el vector recombinante según la reivindicación 4.
6. Un procedimiento para producir, en una célula huésped, una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano que comprende sobreexpresar un gen que codifica una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano transformando una célula huésped con el vector recombinante según la reivindicación 4.
- 20 7. El procedimiento para producir una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano según la reivindicación 6, **caracterizado porque** la célula huésped es *E. coli*.
- 25 8. Una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano producida mediante el procedimiento según la reivindicación 6.
- 30 9. Una composición cosmética para regenerar la piel y mejorar las arrugas de la piel que comprende, como componente eficaz, una proteína de fusión de la toxina botulínica y el factor de crecimiento epidérmico humano con un aumento de la proliferación celular y efecto antioxidante que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

35

FIG. 1

Esquema de expresión BTAL-EGF

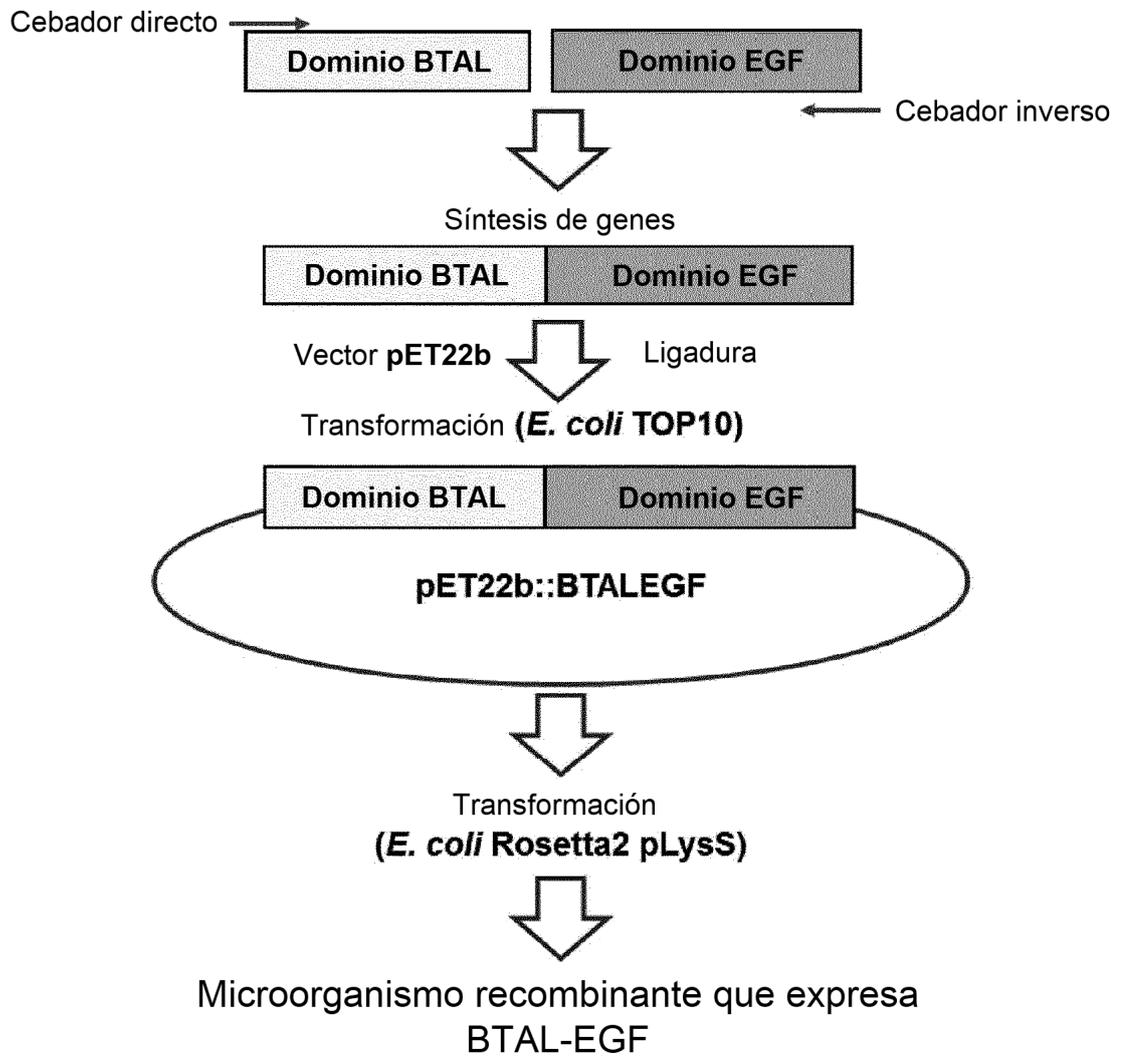


FIG. 2

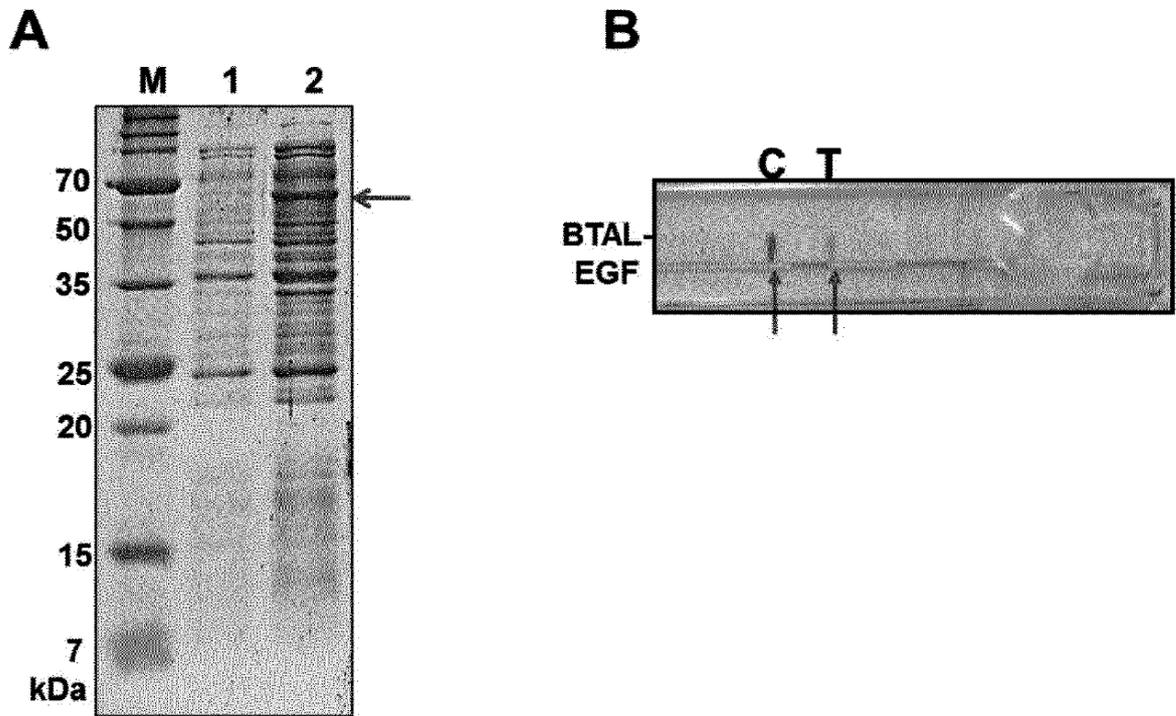


FIG. 3

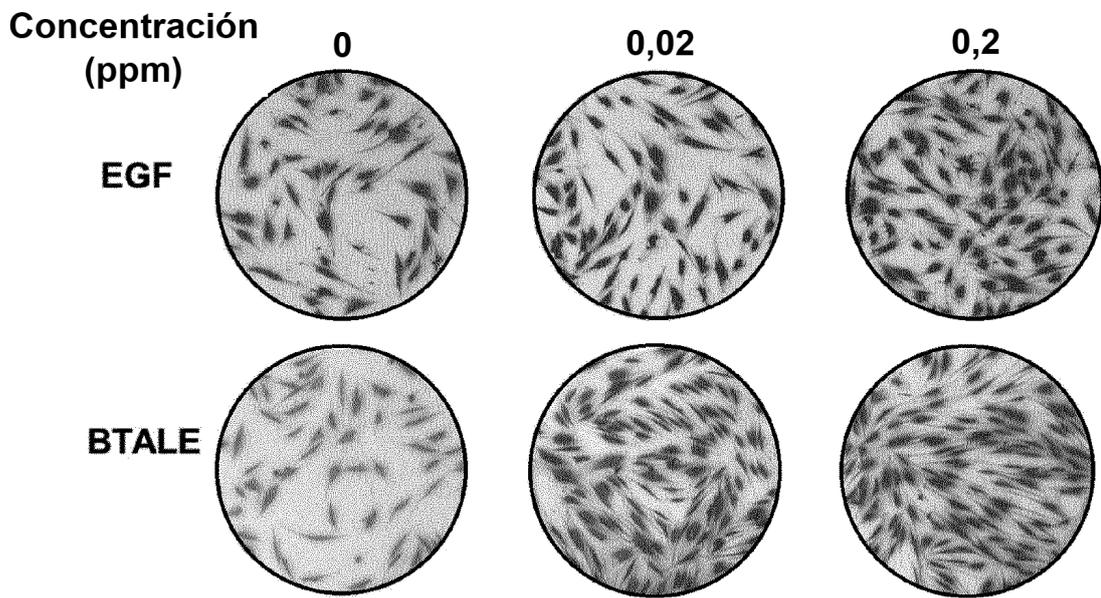


FIG. 4

