

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 282**

51 Int. Cl.:

C07K 14/485 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 15/62 (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/KR2016/007984**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2017 WO17209347**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2016 E 16904146 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3339319**

54 Título: **Proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña que tiene un mayor efecto de la proliferación celular en la piel y una composición cosmética para mitigar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad, que contiene la misma como ingrediente activo**

30 Prioridad:

03.06.2016 KR 20160069272

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

08.06.2020

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;
KIM, TAE HYUN;
CHOI, TAE WON;
JEONG, TAE HWA y
KWON, HYEONG IL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 765 282 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

Proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña que tiene un mayor efecto de la proliferación celular en la piel y una composición cosmética para mitigar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad, que contiene la misma como ingrediente activo.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con un mayor efecto de la proliferación celular en la piel y una composición cosmética para mitigar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad de la piel que comprende la misma como componente efectivo.

Técnica antecedente

10 La piel está compuesta de epidermis, dermis y tejido subcutáneo. Mientras que proporciona protección contra un ataque de microbios que se introducen desde el exterior, la piel juega un papel muy importante para mantener la humedad y la temperatura corporal. La epidermis desempeña un papel de protección de la piel, regula la temperatura corporal y mantiene la humedad corporal, y está compuesta por una matriz extracelular que está relacionada con la elasticidad y la flexibilidad de la piel. La dermis está directamente relacionada con el envejecimiento de la piel.

15 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 la 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 señales intracelular. Como resultado de esos procesos, se promueve la glucólisis y la síntesis de proteínas en una célula, lo que finalmente conduce al crecimiento celular.

20 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 en la transferencia de las células de la piel, y por lo tanto fenómenos como el envejecimiento de la piel, aumento de las arrugas y una reducción en la elasticidad de la piel se exhiben en consecuencia.

25 El PnTx2-6 como el veneno de araña de una araña errante brasileña (*Phoneutria nigriventer*) está compuesto por 403 nucleótidos que consisten en muchos glutamatos y péptidos señal. Se sabe que PnTx2-6 tiene influencia en un flujo a través de un canal de iones de sodio e induce una erección en una rata anestesiada.

30 Como el veneno de araña de una araña errante brasileña, se conocen 100 o más tipos de polipéptidos con un tamaño de 3.500 a 9.000 Da. Al inducir la secreción de acetilcolina y glutamato en forma sensible a TTX (tetrodotoxina), aumenta la introducción de iones de sodio en un sinaptosoma cortical, evitando así la inactivación de un canal de sodio. En consecuencia, se produce un fenómeno de priapismo.

35 Como uno de los venenos de araña de una araña errante brasileña que causa un fenómeno de priapismo, PnTx2-6 se ha estudiado continuamente en todo el mundo desde 2010 como una proteína natural que se puede utilizar como un sustituto del Viagra. Sin embargo, todavía no se conoce el mecanismo de trabajo intracelular preciso de PnTx2-6, y solamente se conocen pocos estudios relacionados con una producción a gran escala de PnTx2-6 para su uso como una proteína natural que puede sustituir al Viagra.

40 Mientras tanto, en el Registro de Patente Coreana No. 1613302, se divulga a "el polipéptido SV82 y una composición cosmética para mejorar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad de la piel que comprende la misma como componente efectivo". Además, en la Publicación de Solicitud de Patente Coreana No. 2015-0056022, se divulga a "una composición cosmética para mejorar la piel que comprende a una proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico". Sin embargo, no se ha realizado ninguna descripción para la proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con un mayor efecto de la proliferación celular en la piel y una composición cosmética para mejorar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad de la piel que comprende la misma como componente efectivo de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

45 Problemas técnicos a resolver

La presente invención se diseña en vista de las circunstancias descritas anteriormente, y de acuerdo con la fusión del factor de crecimiento epidérmico humano a una proteína de veneno de araña, los inventores de la presente invención produjeron una nueva proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña teniendo un mayor efecto de la proliferación celular en la piel. La proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña no solamente puede promover la proliferación celular en la piel, sino que también tiene una excelente termoestabilidad. Por lo tanto, como resultado de la producción de diversas formulaciones cosméticas (por ejemplo, piel, esencia, loción y crema) que contienen la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña como un componente efectivo y de llevar a cabo una prueba cutánea, el

efecto de mejorar las arrugas de la piel y el mantenimiento de la elasticidad de la piel se confirmó con un sujeto de prueba. En consecuencia, se completó la presente invención

Medios técnicos para resolver los problemas

5 Para resolver los problemas descritos anteriormente, la presente invención proporciona una proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con un mayor efecto de proliferación de las células de la piel que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

La presente invención también proporciona a un gen que codifica para la proteína de fusión mencionada anteriormente.

La presente invención también proporciona a un vector recombinante que comprende el gen mencionado anteriormente.

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

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

15

La presente invención también proporciona una composición cosmética para mejorar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad de la piel que comprende, como componente efectivo, una proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Efecto ventajoso de la invención

20 El procedimiento de producción en *E. coli* utilizando el gen con codones optimizados de *E. coli* que codifica para la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña 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 las proteínas. Además, como la proteína de fusión

25 mencionado anteriormente tiene termostabilidad y una excelente función para mejorar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad de la piel, se espera que la proteína de fusión se utilice ventajosamente como materia prima de cosméticos funcionales.

Descripción breve de los dibujos

30 La Figura 1 es un dibujo esquemático que ilustra el proceso para preparar el plásmido recombinante (pET22b::ESV) que incluye a un gen que codifica para la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (ESV) y la transformación de *E. coli* con el plásmido.

La Figura 2 muestra los resultados de la expresión de *E. coli* y la determinación por separación de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (es decir, la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña que tiene el factor de crecimiento epidérmico humano fusionado con el amino terminal de la proteína de veneno de araña; ESV). La Fig. 2A muestra los resultados de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida que se ha llevado a cabo para determinar la presencia o la ausencia de la expresión: 1; marcador de tamaño, de 2 a 4; lisado celular bruto antes de la inducción de la expresión, 5 a 7; lisado celular bruto después de la inducción de la expresión, 8; proteínas solubles en agua totales después de la inducción de la expresión, 9; proteínas insolubles totales (es decir, cuerpo de inclusión) después de la inducción de la expresión, y la flecha; ESV esperado. La Figura 2B muestra los resultados de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña que finalmente se ha separado utilizando una columna de níquel-agarosa. La Figura 2C muestra el resultado de determinar el dominio del factor de crecimiento epidérmico humano utilizando un kit de detección de EGF en el que se realizó la determinación para examinar el dominio del factor de crecimiento epidérmico humano de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña finalmente separada. En la Fig. 2C, C representa el control EGF y T representa una muestra de prueba.

45 La Figura 3 es una imagen fotográfica en la que se muestra el efecto de la proliferación de fibroblastos dérmicos después del tratamiento de fibroblastos dérmicos con la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (ESV) mediante tinción con cristal violeta.

50 La Figura 4 es una imagen fotográfica en la que la presencia o ausencia de la proliferación de fibroblastos dérmicos después del tratamiento de fibroblastos dérmicos con la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (ESV), que ha sido sometida a esterilización gamma o a esterilización a alta presión, se muestra para la determinación de la estabilidad térmica de la proteína de fusión, en la que la proliferación celular de los fibroblastos dérmicos se determinó por tinción con cristal violeta.

La Figura 5 es una gráfica que ilustra el resultado del efecto de proliferación de células HaCaT después del tratamiento de células HaCaT con la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (ESV).

5 La Figura 6 es una imagen fotográfica que muestra el efecto de la curación de heridas en células HaCaT después del tratamiento de células HaCaT con la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (ESV).

La Figura 7 es una gráfica que muestra la fusión entre las células HaCaT y la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña después de tratar a las células HaCaT en un multi-pocillo recubierto con la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (ESV).

10 Mejor(es) modo(s) para realizar la invención

Para lograr el objeto de la presente invención, la presente invención proporciona una proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con un mayor efecto de proliferación de las células de la piel que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

15 El alcance de la proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña de acuerdo con la presente invención incluye a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, y también equivalentes funcionales de la proteína. El término "equivalente funcional" indica a una proteína que tiene, como resultado de la adición, sustitución o delección de un aminoácido, al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% e incluso más preferiblemente al menos 95% de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, e indica a una proteína
20 que exhibe sustancialmente la misma actividad fisiológica que la proteína representada por la SEQ ID NO: 2. La expresión "sustancialmente la misma actividad fisiológica" significa la actividad de mejorar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad de la piel. Además, en la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña se incluye un fragmento, un derivado y un análogo de la misma. Los términos "fragmento", "derivado" y "análogo" que se utilizan en este documento indican aun polipéptido que tiene sustancialmente la misma función o actividad fisiológica que la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña de la presente invención.

25 La proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña de la presente invención consiste preferiblemente en 103 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y puede ser una proteína nueva que se produce por fusión entre el factor de crecimiento epidérmico humano que consiste en los aminoácidos 1 al 53 y la proteína del veneno de araña que consiste en los aminoácidos 54 al 103 de la secuencia de aminoácidos anterior.

30 La presente invención proporciona además a un gen que codifica para la proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con un mayor efecto de proliferación de las células de la piel. Este gen puede consistir en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 de *E. coli* optimizada por codón, pero sin limitarse a los mismos.

35 El gen que codifica para la proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con un efecto incrementado en la proliferación celular de la piel 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 alcance de la presente invención. Específicamente, el gen descrito anteriormente puede comprender a una secuencia de nucleótidos que tiene preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 95% de homología de 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. En 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.

40 La "optimización por codón" significa una modificación del codón de un polinucleótido que codifica para una proteína con un codón que se utiliza preferencialmente que otros en un organismo específico de tal manera 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 del uso de codones puede ser incluso mayor en relación con un determinado gen, un gen con función común o del origen del ancestro, una proteína expresada a un alto nivel frente a proteínas con un bajo número de copias, o una región de codificación de un grupo de proteínas en el genoma de un organismo. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 de la presente invención es una secuencia que se ha optimizado por codón de *E. coli* de tal forma que el gen que codifica para la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña se pueda expresar bien en *E. coli*.

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

El término "recombinante" indica una célula que replica a un nucleótido heterogéneo o que expresa a 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 del gen en forma de sentido o antisentido, que no se encuentran en el estado natural de la célula. Además, una célula recombinante puede expresar a 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 del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña puede insertarse 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 utilizar generalmente si se puede replicar y se estabiliza en un huésped. Las características importantes del vector de expresión incluyen que comprenda un origen de replicación, un promotor, un gen marcador y un elemento de control de la traducción.

El vector de expresión que comprende a la secuencia génica que codifica para la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña 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 la traducción y un terminador de la transcripción.

El vector recombinante de acuerdo con una realización de la presente invención se prepara mediante fusión en marco del extremo 5' terminal (sitio de la enzima de restricción NdeI) y en el extremo 3' (sitio de la enzima de restricción XhoI) del gen que codifica para la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (SEQ ID NO: 1) al vector pET22b, y es un vector caracterizado porque puede producir la proteína de fusión de factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña basado en la expresión efectiva del gen 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 estables y continuas del vector de la presente invención, se puede utilizar cualquier célula huésped conocida en la técnica pertinente. Los ejemplos de las células procariotas incluyen a *Bacillus* sp. cepa 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 las bacterias y cepas intestinales que incluyen a *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y varias *Pseudomonas* sp. etcétera.

Además, cuando una célula eucariota se transforma con el vector de la presente invención, la levadura (*Saccharomyces 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 la línea celular MDCK, una célula vegetal y similares pueden utilizarse 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 no está limitada 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 de CaCl₂, 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 puede introducirse 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 del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña que comprende sobreexpresar a un gen que para codifica una proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña 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 preferiblemente *E. coli*, y más preferiblemente *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS, pero no limitado a las mismas.

La presente invención proporciona además una composición cosmética para mejorar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad de la piel que comprende, como componente efectivo, una proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña 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 del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña puede ser del 0,000001 al 0,02% en peso con respecto al peso total de la composición cosmética, pero no limitado a la misma.

En la composición cosmética de la presente invención, los componentes que se utilizan típicamente para una composición cosmética se incluyen además de los componentes efectivos que se describen anteriormente. Ejemplos de los mismos incluyen un material lipídico, un disolvente 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, un agente de carga, un agente secuestrante de iones metálicos, un agente quelante, un conservador, vitamina, un agente bloqueante, un agente humectante, aceite esencial, un tinte, un pigmento, un agente activador hidrofílico o lipofílico, 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 puede formularse 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 puede formularse 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 de masaje, una crema para los ojos, una crema para la humedad, 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 tiene un tipo de formulación de pasta, crema o gel, es posible utilizar, 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 tiene un tipo de formulación de polvo o aerosol, es posible utilizar, 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 propulsor tal como clorofluorohidrocarburo, propano/butano o dimetil éter.

En un caso en el que la composición cosmética de la presente invención tiene un tipo de formulación de solución o emulsión, se utiliza un disolvente, 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 tiene un tipo de suspensión de formulación, es posible utilizar, como componente portador, un diluyente en fase líquida tal como agua, etanol o propilenglicol, un agente de suspensión tal como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de polioxietilén sorbitol o éster de polioxietilén sorbitano, 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 dan solo a modo de ejemplificar a la presente invención y de ninguna manera la presente invención se limita a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación del vector de expresión recombinante y del microorganismo recombinante transformado para producir la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña

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

Mediante el uso como plantilla de los genes que codifican para la proteína del veneno de araña o el factor de crecimiento epidérmico humano utilizado como proteína asociada, el fragmento del gen (SEQ ID NO: 1) que codifica para la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña que consiste en 103 aminoácidos y que ha sido optimizado para la expresión en un microorganismo huésped fue preparado y sintetizado.

Para sintetizar el gen que codifica para la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (SEQ ID NO: 2) que tiene la proteína del veneno de araña unida al carboxilo terminal (C-terminal) del factor de crecimiento epidérmico humano, nucleótido de 159 pb (es decir, del nucleótido 1 al 159 de la SEQ ID NO: 1) que codifica para el factor de crecimiento epidérmico humano, que ha sido optimizado para *E. coli*, se sintetizó utilizando un cebador directo 1 (5'-AAGGAGATATACATATGAACTCAGAC-3', SEQ ID NO: 3) y un cebador inverso 1 (5'-AGCCCTGGCGCGCAACTC-3', SEQ ID NO: 4). Además, se sintetizó un nucleótido de 150 pb (es decir, los nucleótidos 160 al 309 de la SEQ ID NO: 1) que codifica para la proteína del veneno de araña, que se ha optimizado para *E. coli*, utilizando un cebador directo 2 (5'-GAGTTGCGCGCCAGGGCT-3', SEQ ID NO: 5) y un cebador inverso 2 (5'-GTGCTCGAGTTTCTTGCA-3', SEQ ID NO: 6)

Al tener cada uno de los genes que codifican para el factor de crecimiento epidérmico humano o para la proteína del veneno de araña, que se han sintetizado por el procedimiento descrito anteriormente, como templado y también

utilizando un cebador directo 1 (SEQ ID NO: 3) y un cebador inverso 2 (SEQ ID NO: 6), un gen que consta de 309 nucleótidos que codifican para una proteína de fusión en la que la proteína del veneno de araña se une al C-terminal del factor de crecimiento epidérmico humano, se obtuvo finalmente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5 El fragmento de gen y el plásmido recombinante mencionados anteriormente se digirieron con las mismas enzimas de restricción (extremo 5' con NdeI y extremo 3' con XhoI) seguido de la inserción, y así se preparó el plásmido recombinante (pET22b::ESV) 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.

10 Posteriormente, *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 del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña.

Ejemplo 2. Inducción de la expresión, aislamiento y purificación de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña

15 *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS preparada en el Ejemplo 1 se cultivó en 1l de medio LB (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 una $OD_{600}=0.6$ a 0.8 para cultivo en lote, u $OD_{600}=15$ a 20 para cultivo continuo utilizando un aparato de fermentación de 20 l. Después de esto, al agregar IPTG de 1 a 5 mM o 2% de lactosa (ambos en concentración final) a cada medio del cultivo celular, se indujo la expresión de *E. coli* recombinante. Después de la inducción de la expresión génica, las células se cultivaron
20 adicionalmente durante 3 a 4 horas, y posteriormente se recolectaron por centrifugación. Las células recolectadas 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 dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4)/l, pH 7.4) y se rompieron utilizando un homogeneizador de células ultrasónico. Como resultado, se separó una solución que contenía proteínas intracelulares.

25 Mediante el uso de la solución separada anteriormente como muestra, se examinó la expresión de proteínas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 15%. Como resultado, se confirmó la expresión de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña a partir del lisado de células bruto en el que la inducción de la expresión se ha llevado a cabo con IPTG o con lactosa (Figura 2A).

30 Para poder aislar y purificar a la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña cuya expresión se ha confirmado anteriormente, el cuerpo de inclusión se solubilizó utilizando una solución tampón solubilizante (urea 5M, pH 11), y posteriormente se sometió a un proceso de replegamiento con filtración ultrafina (membrana de filtración fina de 0,45 μ m y membrana de filtración ultrafina de 1K). En consecuencia, la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña finalmente se aisló mediante el uso de una solución tampón de almacenamiento (PBS).

35 Para la purificación completa de la proteína de fusión anterior, la proteína de fusión aislada se pasó a través de una columna de níquel-agarosa a una tasa de 1 a 3 ml/minuto. Posteriormente, la columna se lavó varias veces con una solución tampón de unión, y al agregar una solución de imidazol 50, 1000 y 250 mM (pH 7.4) a la columna, la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña se fraccionó en una porción de 1 ml y se eluyó de la columna. Posteriormente, el imidazol presente en el tampón se eliminó utilizando un tampón de fosfato de
40 potasio 10 mM y, por lo tanto, la proteína de fusión finalmente se purificó en un estado puro. Para determinar el resultado, se llevó a cabo una electroforesis en gel de SDS-acrilamida al 15%. Como resultado, la proteína de fusión finalmente purificada se confirmó con un tamaño casi esperado (es decir, aproximadamente 14 a 16 kDa, incluida la etiqueta de His) (Figura 2B). Finalmente, mediante el uso de un kit de detección de EGF, se confirmó el dominio de EGF en la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (Figura 2C).

45 **Ejemplo 3.** Medición de la actividad de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña – efecto de la proliferación en el fibroblasto dermal

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

50 Después de cultivar fibroblastos dérmicos (fibroblastos dérmicos de adulto humano, células HDFa), las células se trataron con la proteína de fusión a una concentración de 0, 0,02 ppm o 0,2 ppm, seguido de su 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 del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (0,02 a 0,2 ppm) (Figura 3). Además, en
55 comparación con cada uno de los grupos de tratamiento de proteínas individuales (EGV y SV), se observó un mayor efecto en la proliferación celular con la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno

de araña (ESV). Este resultado indica que cada uno de EGF y SV en la proteína de fusión no corresponde a una proteína de longitud completa sino que corresponde a cada dominio activo utilizado para la producción de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña, y cuando el tratamiento se lleva a cabo utilizando a cada proteína o la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (ESV) a la misma concentración (por ejemplo, 0,02 ppm), el número molar de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (ESV) es aproximadamente 1/2 de EGF y SV, respectivamente. Por lo tanto, si se exhibe una proliferación de fibroblastos dérmicos similar a la misma concentración, se cree que la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña tiene el efecto de proliferación de fibroblastos dérmicos que es casi 2 veces mayor que EGF y SV, respectivamente. Como se muestra en la Figura 3, en comparación con EGF y SV, hay un mayor número de fibroblastos dérmicos cuando se trata con proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña, lo que indica un efecto de proliferación de fibroblastos dérmicos que es casi 2 veces mayor que EGF y SV, respectivamente. Con base en los resultados anteriores, se cree que la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña tiene un efecto mejorado en la proliferación celular de la piel.

Ejemplo 4. Análisis de termoestabilidad de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña

Con la selección de una muestra a partir de la cual se ha confirmado la presencia de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña aislada y purificada como se describe en el Ejemplo 2, se realizó una prueba de termoestabilidad. Para la prueba de termoestabilidad, el fibroblasto dérmico se trató con la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña a una concentración de 0,02 a 0,2 ppm, que se sometió a esterilización gamma (irradiación de 35 kgray) o esterilización a alta presión (tratamiento a 121°C durante 15 minutos), seguido de su cultivo durante 3 días a 37°C. Posteriormente, se determinó el grado de la proliferación celular dependiendo del tratamiento protéico con base en la tinción con cristal violeta.

Como resultado, se encontró que la proliferación celular causada por la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña en el grupo de esterilización gamma o el grupo de esterilización a alta presión era similar a la proliferación celular de un grupo sin ningún tratamiento por calentamiento. (Figura 4).

Con base en el resultado anterior, se encontró que la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña de la presente invención mantiene la actividad proteica incluso después de un tratamiento por calentamiento, y la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña de la presente invención con efecto aumentado de la proliferación celular de la piel se utiliza muy ventajosamente para la producción de un producto cosmético sin conservadores que se produce utilizando un procedimiento de tratamiento por calentamiento.

Ejemplo 5. Medición de la actividad de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña - Proliferación celular, cicatrización de heridas y efecto de adhesión celular en células HaCaT

Con la selección de una muestra a partir de la cual se ha confirmado la presencia de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña aislada y purificada como se describe en el Ejemplo 2, se midió la actividad de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña. La medición de la actividad de la proteína de fusión se llevó a cabo cultivando células HaCaT, tratando a las células cultivadas con la proteína de fusión a una concentración de 0, 0,02 ppm, 0,2 ppm, 2 ppm y 20 ppm, y analizando la proliferación celular de la herida. curación y adhesión celular en las células cultivadas.

Primero, cuando se realizó el análisis de la proliferación celular utilizando el reactivo de viabilidad celular PrestoBlue™ (Invitrogen, E.U.), Se confirmó el efecto de la proliferación celular HaCaT causado por un tratamiento de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña. Además, a medida que aumenta la concentración de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (0,02 a 20 ppm), se observó un efecto de la proliferación celular más favorable (Figura 5).

Después de cultivar células HaCaT en un pocillo, se añadió a la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña a una concentración de 0, 0,02 ppm, 0,2 ppm, 2 ppm y 20 ppm. Posteriormente, las células se observaron cada 6 horas con un microscopio (Olympus CK40, Olympus, Japón) para examinar el efecto de la curación de las heridas en las células HaCaT. Cuando se comparó con un grupo de control sin tratamiento (es decir, ningún tratamiento con la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña), las células HaCaT tratadas con la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña mostraron un efecto de curación de las heridas, y fue se muestra particularmente que el efecto es más fuerte a medida que aumenta la concentración de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña (0,02 a 20 ppm) (Figura 6).

Como último paso, la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con una concentración de 0, 0,02 ppm, 0,2 ppm, 2 ppm y 20 ppm se revistió en una placa de 96 pocillos, que posteriormente se trató con células HaCaT seguidas de su cultivo durante 1 día a 37°C. Después de esto, al utilizar el reactivo de viabilidad celular PrestoBlue™, se analizó el efecto de adhesión entre las células y la proteína de fusión del factor de

crecimiento epidérmico humano con veneno de araña. Como resultado, se demostró que las células HaCaT tratadas con proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña exhibieron un mayor efecto de adhesión en comparación con el grupo de control negativo que se había tratado con BSA (albúmina de suero bovino). Por lo tanto, se confirmó el efecto de adhesión de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña sobre una célula de la piel (Figura 7).

Ejemplo de prueba 1. Mejoramiento 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 del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña que se ha aislado y purificado como se describe en el Ejemplo 2 como un componente efectivo, las composiciones cosméticas de los Ejemplos de preparación 1, 2, 3 y 4 y los ejemplos Comparativos 1, 2, 3 y 4 fueron preparados y utilizados para una prueba sensorial.

Específicamente, para confirmar cualquier mejora de las arrugas, un total de 30 hombres y mujeres con 30 años o más, pero menores de 60 (10 en 30's, 10 en 40's, y 10 en 50's y 60's) como sujetos se les permitió aplicar, una vez al día durante 2 semanas seguidas, la composición del ejemplo Comparativo (es decir, el grupo control) alrededor del área de los ojos en el lado izquierdo de la cara o alrededor del lado izquierdo de los labios en donde 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 la cara o alrededor del lado derecho de los labios. La evaluación se realizó en función del nivel de reducción de las arrugas alrededor del ojo o de los labios. Además, también para el efecto de mantenimiento de la elasticidad de la piel como uno de los elementos funcionales descritos anteriormente, el grado de mantenimiento de la elasticidad de la piel se evaluó de acuerdo con el mismo procedimiento descrito anteriormente. 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 con base en criterios de evaluación de cinco puntos, es decir, muy excelente (5 puntos), excelente (4 puntos), moderada (3 puntos), pobre (2 puntos) y muy pobre (1 punto).

<Ejemplo de preparación 1 y ejemplo Comparativo 1>

Mediante la adición de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña como un componente efectivo y que tiene los componentes y el contenido que se describen a continuación en la Tabla 1, se preparó una piel del ejemplo de Preparación 1.

Además, sin agregar la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña como un componente efectivo pero que tiene los componentes y el contenido que se describen a continuación en la Tabla 1, se preparó una piel del ejemplo Comparativo 1.

[Tabla 1]

Composición de la piel		
Componente	Ejemplo de preparación 1 (% en peso)	Ejemplo Comparativo 1 (% en peso)
Proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña	0,01	-
Stock de aminoácidos	0,1	0,1
Mezcla de minerales	0,0007	0,0007
Agua purificada	q.s.	q.s.

Los resultados de la prueba sensorial del Ejemplo de preparación 1 y el Ejemplo comparativo 1 son como se muestran a continuación en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Resultados de la prueba sensorial del ejemplo de Preparación 1 y el ejemplo Comparativo 1			
No.	Prueba sensorial sobre mejora de arrugas y efecto de mantenimiento de la elasticidad de la piel.		Irritación de la piel
	Mejoramiento de las arrugas	Efecto del mantenimiento de la elasticidad de la piel	

		Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación
30's	1	4	3	5	3	4
	2	4	3	4	3	5
	3	4	3	4	3	4
	4	4	3	3	3	4
	5	4	2	4	2	4
	6	4	2	4	3	4
	7	4	3	5	3	4
	8	4	2	4	3	4
	9	4	2	4	3	5
	10	3	3	4	3	4
40's	11	4	2	5	3	4
	12	4	2	5	2	4
	13	4	2	4	3	5
	14	5	3	5	2	5
	15	5	2	4	2	5
	16	4	3	4	2	4
	17	5	2	5	2	5
	18	4	3	5	3	5
	19	5	3	4	3	5
	20	4	3	5	2	4
50's y 60's	21	5	2	4	3	5
	22	5	2	4	2	5
	23	5	2	5	2	5
	24	4	3	4	2	5
	25	3	2	5	2	4
	26	5	3	4	2	4
	27	5	2	5	3	5
	28	5	2	4	2	5
	29	4	2	5	3	5
	30	4	2	5	2	4
Promedio		4,2	2,4	4,4	2,5	4,5

<Ejemplo de Preparación 2 y ejemplo Comparativo 2>

5 Mediante la adición de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña como un componente efectivo y que tiene los componentes y el contenido que se describen a continuación en la Tabla 3, se preparó una esencia del ejemplo de Preparación 2.

Además, sin agregar la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña como un componente efectivo pero que tiene los componentes y el contenido que se describen a continuación en la Tabla 3, se preparó una esencia del ejemplo Comparativo 2.

[Tabla 3]

Composición de la esencia		
Componente	Ejemplo de preparación 2 (% en peso)	Ejemplo comparativo 2 (% en peso)
Proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña	0,01	-
Stock de aminoácidos	0,05	0,05

ES 2 765 282 T3

Mezcla de minerales	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 y el Ejemplo Comparativo 2 son como se muestran a continuación en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Resultados de la prueba sensorial del ejemplo de Preparación 2 y el ejemplo Comparativo 2						
No.	Prueba sensorial sobre mejora de arrugas y efecto de mantenimiento de la elasticidad de la piel.					Irritación de la piel
	Mejoramiento de las arrugas		Efecto del mantenimiento de la elasticidad de la piel			
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	
30's	1	4	3	5	3	4
	2	4	2	4	3	5
	3	4	3	4	3	4
	4	5	3	4	3	4
	5	4	2	3	3	4
	6	5	3	4	3	4
	7	4	3	4	3	4
	8	5	2	5	3	4
	9	4	4	5	2	5
	10	4	3	4	3	4
	11	5	3	5	3	5
	12	4	3	4	2	5
	13	4	2	5	3	5

5

(continuación)

Resultados de la prueba sensorial del ejemplo de Preparación 2 y el ejemplo Comparativo 2						
No.	Prueba sensorial sobre mejora de arrugas y efecto de mantenimiento de la elasticidad de la piel.					Irritación de la piel
	Mejoramiento de las arrugas		Efecto del mantenimiento de la elasticidad de la piel			
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	
	14	5	3	5	3	5

40's	15	5	2	5	3	5
	16	5	2	4	2	4
	17	5	3	5	3	5
	18	4	3	5	3	5
	19	5	3	4	3	5
	20	4	3	5	2	5
50's y 60's	21	5	3	4	3	5
	22	5	3	5	4	5
	23	5	2	5	3	5
	24	4	3	5	3	5
	25	5	2	4	3	5
	26	5	3	5	2	4
	27	5	3	5	3	5
	28	5	3	4	3	5
	29	4	3	5	3	5
	30	5	4	5	3	4
Promedio		4,6	2,8	4,5	2,9	4,6

<Ejemplo de preparación 3 y ejemplo Comparativo 3>

5 Al agregar la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña como un componente efectivo y con los componentes y el contenido que se describen a continuación en la Tabla 5, se preparó una loción del ejemplo de Preparación 3.

Además, sin agregar la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña como un componente efectivo pero que tiene los componentes y el contenido que se describen a continuación en la Tabla 5, se preparó una loción del ejemplo Comparativo 3.

10

[Tabla 5]

Composición de la loción		
Componente	Ejemplo de preparación 3 (% en peso)	Ejemplo comparativo 3 (% en peso)
Proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña	0,01	-
Stock de aminoácidos	0,05	0,05
Mezcla de minerales	0,0007	0,0007
Glicerol	3	3

ES 2 765 282 T3

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.

Los resultados de la prueba sensorial del ejemplo de Preparación 3 y el ejemplo Comparativo 3 son como se muestran a continuación en la Tabla 6.

[Tabla 6]

Resultados de la prueba sensorial del ejemplo de Preparación 3 y el ejemplo Comparativo 3						
No.	Prueba sensorial sobre mejora de arrugas y efecto de mantenimiento de la elasticidad de la piel.					Irritación de la piel
	Mejoramiento de las arrugas		Efecto del mantenimiento de la elasticidad de la piel			
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	
30's	1	4	3	5	3	5
	2	4	3	3	4	5
	3	4	3	3	3	4
	4	3	3	3	3	4
	5	4	2	3	3	4
	6	3	2	3	2	5
	7	4	3	4	3	5
	8	4	3	4	3	4
	9	4	3	5	4	5
	10	4	3	3	3	4
	11	5	3	5	3	5
	12	5	4	5	3	5

5

(continuación)

Resultados de la prueba sensorial del ejemplo de Preparación 3 y el ejemplo Comparativo 3						
No.	Prueba sensorial sobre mejora de arrugas y efecto de mantenimiento de la elasticidad de la piel.					Irritación de la piel
	Mejoramiento de las arrugas		Efecto del mantenimiento de la elasticidad de la piel			
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	

40's	13	5	3	5	2	5
	14	5	3	5	2	5
	15	5	3	5	3	5
	16	5	3	4	2	4
	17	5	4	5	3	5
	18	5	3	5	3	5
	19	5	3	5	1	5
	20	5	3	5	2	5
50's y 60's	21	5	3	5	3	5
	22	5	3	5	2	5
	23	5	2	4	3	5
	24	4	2	4	2	5
	25	4	3	5	3	5
	26	5	3	4	2	4
	27	4	2	5	3	5
	28	5	3	5	3	5
	29	5	2	4	3	5
	30	5	3	5	3	5
Promedio		4,5	2,9	4,4	2,7	4,8

<Ejemplo de Preparación 4 y ejemplo Comparativo 4>

5 Al agregar la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña como un componente efectivo y con los componentes y el contenido que se describen a continuación en la Tabla 7, se preparó una crema del ejemplo de Preparación 4.

Además, sin agregar la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña como un componente efectivo pero que tiene los componentes y el contenido que se describen a continuación en la Tabla 7, se preparó una crema del ejemplo Comparativo 4.

[Tabla 7]

10

Composición de la crema		
Componente	Ejemplo de Preparación 4 (% en peso)	Ejemplo Comparativo 4 (% en peso)
Proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña	0,01	-
Stock de aminoácidos	0,05	0,05
Mezcla de minerales	0,0007	0,0007

ES 2 765 282 T3

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 y el Ejemplo comparativo 4 son como se muestran a continuación en la Tabla 8.

[Tabla 8]

Resultados de la prueba sensorial del ejemplo de Preparación 4 y el ejemplo Comparativo 4						
No.	Prueba sensorial sobre mejora de arrugas y efecto de mantenimiento de la elasticidad de la piel.					Irritación de la piel
	Mejoramiento de las arrugas		Efecto del mantenimiento de la elasticidad de la piel			
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	
30's	1	4	3	4	3	5
	2	4	3	4	2	5
	3	3	3	4	3	4
	4	4	3	5	3	4
	5	4	3	4	3	5
	6	4	2	3	2	4
	7	4	3	4	3	5
	8	3	3	5	3	4
	9	5	3	3	2	5
	10	4	3	4	3	4

ES 2 765 282 T3

(continuación)

Resultados de la prueba sensorial del ejemplo de Preparación 4 y el ejemplo Comparativo 4						
No.	Prueba sensorial sobre mejora de arrugas y efecto de mantenimiento de la elasticidad de la piel.					Irritación de la piel
	Mejoramiento de las arrugas		Efecto del mantenimiento de la elasticidad de la piel		Ejemplo de preparación	
	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo	Ejemplo de preparación	Ejemplo comparativo		Ejemplo de preparación
40's	11	5	3	5	3	5
	12	4	3	5	3	5
	13	5	2	4	2	5
	14	4	3	3	3	5
	15	5	2	5	3	5
	16	5	3	3	2	4
	17	4	2	4	3	5
	18	4	3	4	3	4
	19	5	3	5	2	5
	20	4	2	4	2	5
50's y 60's	21	5	3	4	3	5
	22	5	3	4	2	4
	23	4	2	5	3	5
	24	4	3	4	2	5
	25	4	2	4	2	5
	26	4	3	5	3	4
	27	4	3	4	3	5
	28	3	2	5	3	4
	29	4	3	4	3	5
	30	4	3	4	2	4
Promedio	4,2	2,7	4,2	2,6	4,6	

A partir de los resultados de las pruebas sensoriales que se dan anteriormente, se encontró que, en comparación con los ejemplos Comparativos, los ejemplos de Preparación 1, 2, 3 y 4 en los que como componente efectivo está contenida la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña de la presente invención, son efectivos para mejorar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad de la piel.

<110> Nexgen Biotechnologies, Inc.

<120> Proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con un mayor efecto de la proliferación celular en la piel y una composición cosmética para mejorar las arrugas y mantener la elasticidad de la piel, que comprende la misma como componente efectivo.

ES 2 765 282 T3

<130> PCT1624
<160> 6
<170> KopatentIn 2.0
<210> 1
5 <211> 309
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> EGF-SV
10 <400> 1

aactcagact ctgagtgccc actgtctcac gacggctact gccttcacga cggagtctgc 60
atgtacatcg aggctttgga taagtacgct tgtaattgcg tcgttggta cattggagag 120
cgctgccaat accgtgactt aaaatggtgg gagttgcgcg ccagggtac ctgtgcaggg 180
caggatcagc catgcaaaga aacgtgcat tgctgtggcg aacgtggcga atgcgtgtgt 240
ggcggccgt gcatttctcg ccaaggctat ttctggattg cgtggtacaa actggcgaac 300
tgcaagaaa 309

<210> 2
15 <211> 103
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> EGF-SV
<400> 2

ES 2 765 282 T3

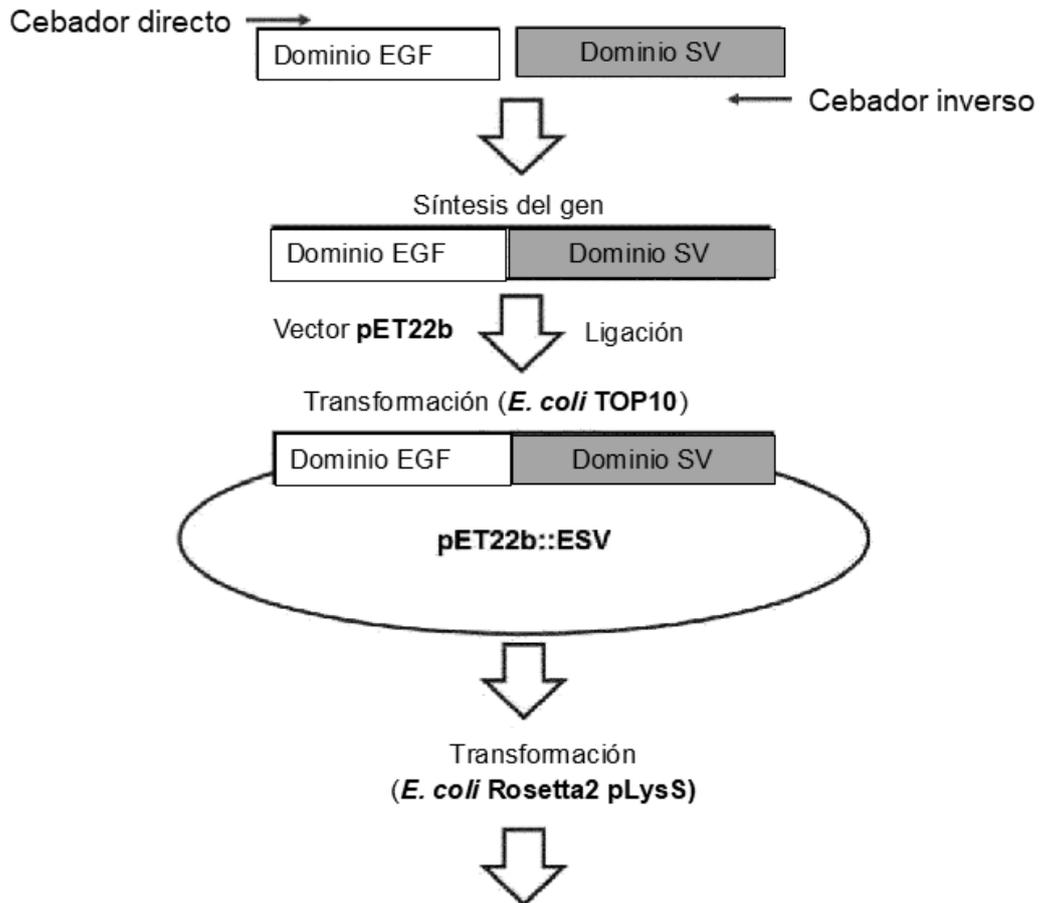
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
5 <400> 5
gagttgcgcg ccagggct 18
<210> 6
<211> 18
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 6
gtgctcgagt ttctgca 18
15

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con un mayor efecto de proliferación de las células de la piel que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 5 2. Un gen que codifica para la proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con un mayor efecto de proliferación de las células de la piel de la reivindicación 1.
3. El gen de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** el gen consiste en la secuencia de nucleótidos optimizada por codón de *E. coli* (*Escherichia coli*) de la SEQ ID NO: 1.
4. Un vector recombinante que comprende el gen de la reivindicación 2 o 3.
- 10 5. Una célula huésped transformada con el vector recombinante de la reivindicación 4.
6. Un procedimiento para producir en una célula huésped una proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña que comprende sobreexpresar un gen que codifica para una proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña transformando a una célula huésped con el vector recombinante de la reivindicación 4.
- 15 7. El procedimiento para producir una proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** la célula huésped es *E. coli*.
8. Una composición cosmética para mejorar las arrugas de la piel y mantener la elasticidad de la piel que comprende, como componente efectivo, una proteína de fusión termoestable del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña con un mayor efecto de proliferación de las células de la piel que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 20

Fig. 1

Esquema de expresión de la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña



Microorganismo recombinante expresando a la proteína de fusión del factor de crecimiento epidérmico humano con veneno de araña

Fig. 2

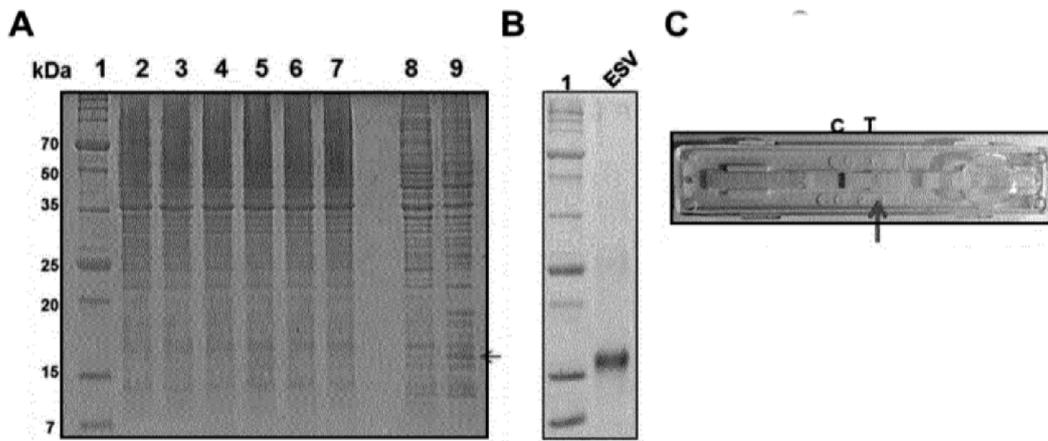


Fig. 3

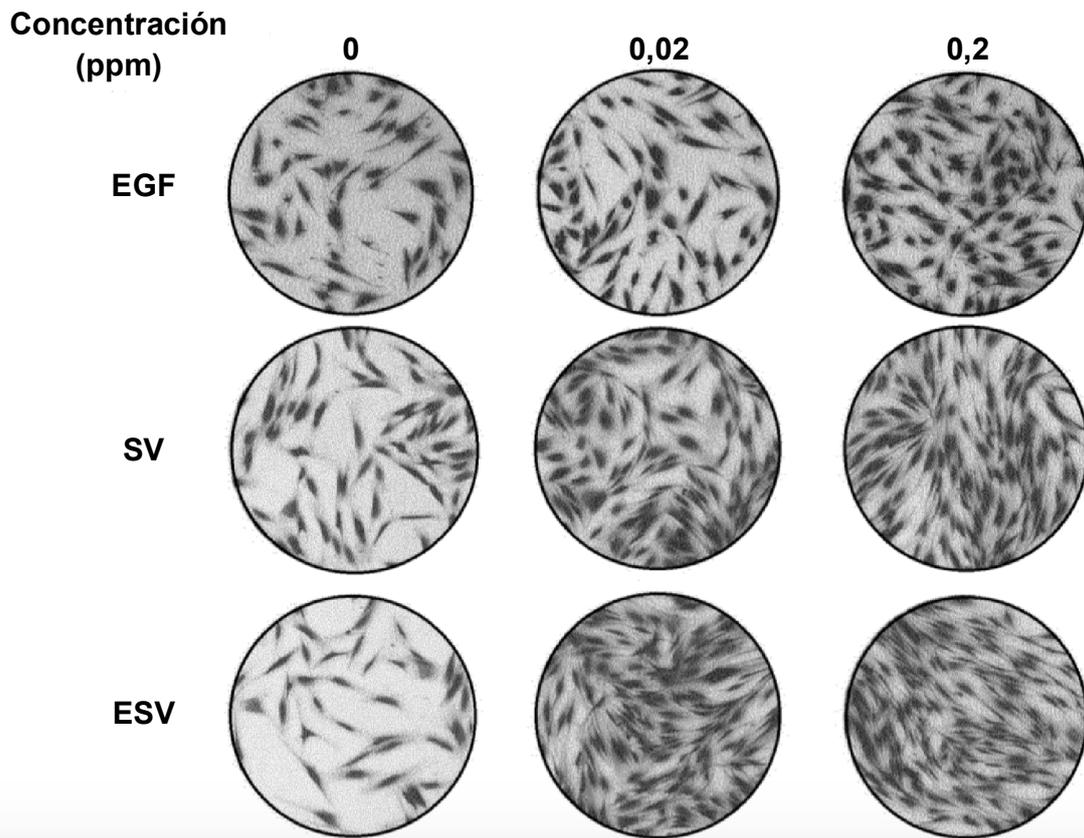


Fig. 4

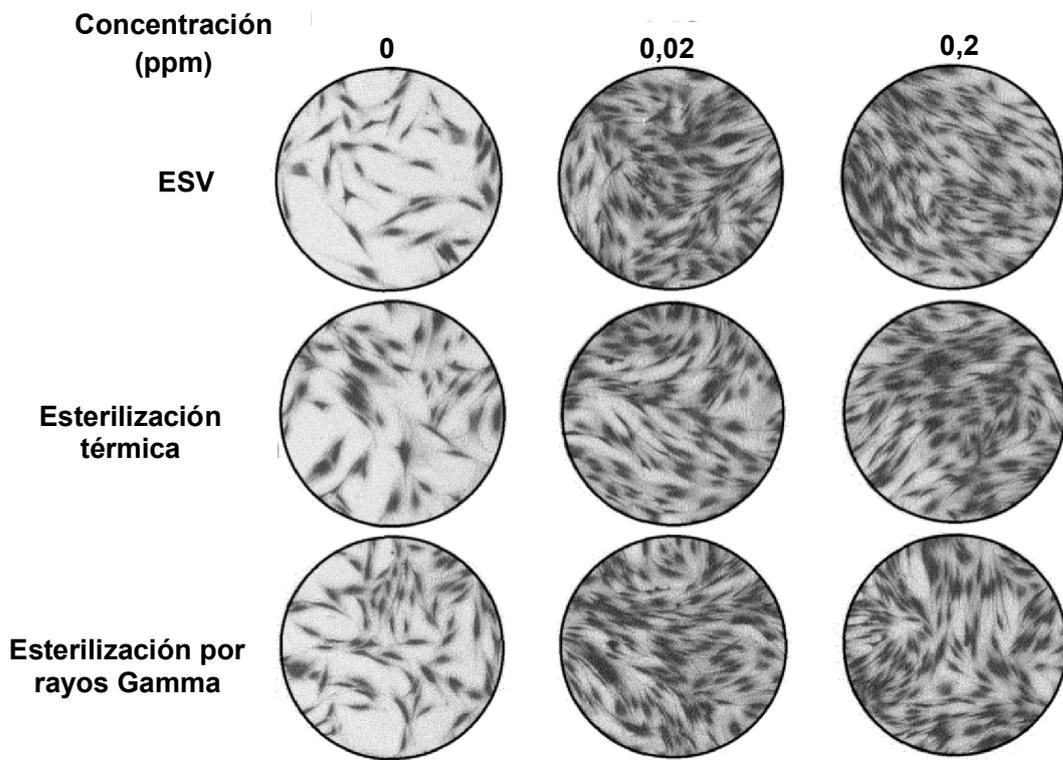


Fig. 5

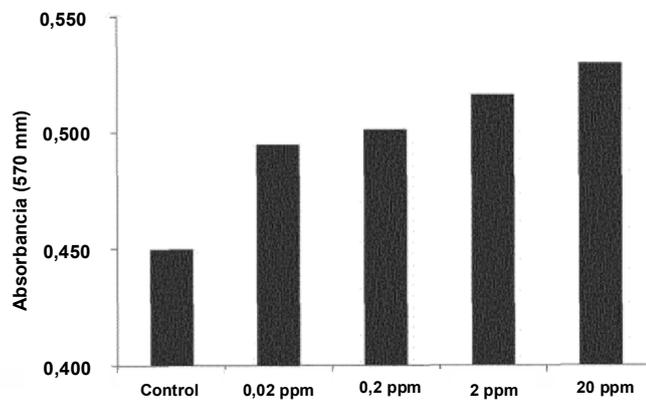


Fig. 6

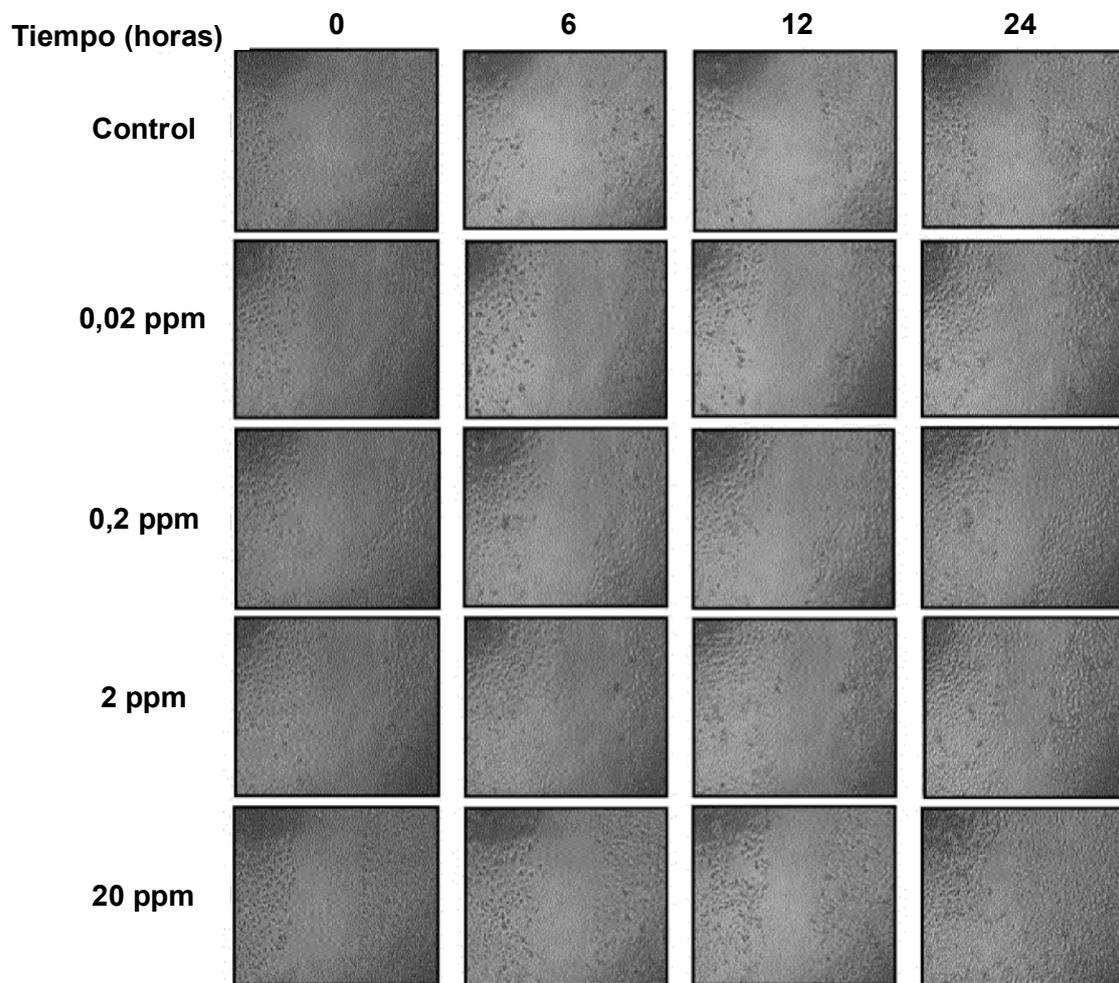


Fig. 7

