

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 927 491**

51 Int. Cl.:

G16C 20/30

(2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2017** **PCT/EP2017/076237**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.05.2018** **WO18086821**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2017** **E 17835586 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2022** **EP 3539031**

54 Título: **Predicción de la permeabilidad de la piel**

30 Prioridad:

14.11.2016 EP 16198643

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

07.11.2022

73 Titular/es:

**ERCO PHARMA AB (100.0%)
Nybrogatan 17
114 39 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**LUNDBORG, MAGNUS;
WENNBERG, CHRISTIAN;
NARANGIFARD, ALI y
NORLÉN, LARS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 927 491 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

Predicción de la permeabilidad de la piel

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a un método para predecir la permeabilidad del estrato córneo de la piel a un compuesto. En particular, la presente descripción se refiere a un método para calcular la permeabilidad predicha al compuesto por medio de simulación por ordenador usando un modelo de una matriz lipídica del estrato córneo. La presente divulgación también se refiere a métodos y usos de dicho modelo para predecir el efecto de los agentes modificadores de la permeabilidad sobre dicha permeabilidad y para predecir el efecto de los agentes modificadores de la permeabilidad sobre la organización de la matriz lipídica del estrato córneo.

15 Antecedentes

El estrato córneo es la capa más externa de la epidermis y sirve para prevenir, por ejemplo, pérdida de agua y penetración de compuestos exógenos a través de la piel. Morfológicamente, el estrato córneo está formado por múltiples pilas de células aplanadas (corneocitos), cada una rodeada de lípidos intercelulares. Estos lípidos pueden denominarse matriz lipídica del estrato córneo, que incluye ceramidas de cadena larga, ácidos grasos libres y colesterol como componentes principales.

Debido a su funcionalidad de barrera, el estrato córneo puede representar tanto un desafío como una oportunidad. La exposición a productos químicos puede ser extensa en la sociedad moderna, y el riesgo de daño por absorción a través de la piel puede ser significativo. Al mismo tiempo, la administración de fármacos a través de la piel, en lugar de, por ejemplo, por vía oral, puede aumentar el control del tratamiento y reducir el riesgo de efectos adversos del fármaco. También, puede ser deseable la administración de compuestos cosméticos en la piel o a través de la piel.

A menudo, la permeabilidad del estrato córneo a la mayoría de las moléculas/compuestos de fármacos es baja y, por lo tanto, el estrato córneo puede representar un obstáculo para, por ejemplo, administración tópica de fármacos. Como resultado, los agentes modificadores de la permeabilidad (PMA) con propiedades potenciadoras de la permeabilidad pueden añadirse o usarse en combinación con formulaciones tópicas y transdérmicas. Asimismo, los PMA con propiedades de disminución de la permeabilidad pueden ser útiles, por ejemplo, proteger los productos químicos tóxicos de entrar en el cuerpo a través de la piel.

Aunque existen muchos PMA que se cree que afectan a la matriz lipídica del estrato córneo, los mecanismos de acción de muchos de ellos no se conocen o sólo se dilucidan parcialmente. Como resultado, la variedad de PMA que pueden usarse fácilmente para superar la funcionalidad de barrera del estrato córneo y la matriz lipídica del estrato córneo es limitada.

La evaluación de la seguridad química y/o la administración de fármacos a través de la piel a menudo se ha llevado a cabo sobre la base de pruebas en animales y/o basándose en modelos cuantitativos de relación estructura-actividad (QSAR). Dichos modelos, que se basan en herramientas estadísticas para, por ejemplo, relacionar variables predictoras (tal como, por ejemplo, descriptores moleculares de sustancias químicas) con variables de respuesta (tal como, por ejemplo, una actividad biológica de las sustancias químicas), pueden ser sensibles a múltiples factores, como la calidad de datos de entrada, la elección de los descriptores y los métodos estadísticos utilizados para el modelado y la validación. Los modelos creados en base a un conjunto de compuestos de entrenamiento pueden dar resultados suficientemente precisos para algunas moléculas, pero pueden no dar predicciones suficientemente precisas para otras moléculas que no forman parte de dicho conjunto de entrenamiento.

Como alternativa, se han utilizado modelos de la matriz lipídica del estrato córneo para calcular, por ejemplo, su permeabilidad a varios compuestos utilizando simulaciones de dinámica molecular (MD). Sin embargo, se ha demostrado que las discrepancias entre los resultados de tales modelos y los datos experimentales son altas. Por ejemplo, se demostró que la permeabilidad calculada de la matriz lipídica del estrato córneo al agua difiere en 1,5 unidades logarítmicas (error cuadrático medio de 2,25 unidades logarítmicas) en comparación con los datos experimentales (Das et al., 2009), mientras que la permeabilidad calculada de la matriz lipídica del estrato córneo a 11 compuestos diferentes (oxígeno, etanol, ácido acético, urea, butanol, benceno, sulfóxido de dimetilo, tolueno, fenol, estireno y etilbenceno) mostró una diferencia de > 2 unidades logarítmicas en promedio (Gupta et al., 2016).

Hoopes et al ("Bilayer structure and Lipid Dynamics in a Model Stratum Corneum with Oleic Acid", Journal of Physical Chemistry Part B: Condensed Matter, Materials, Surfaces, Interfaces & Biophysical, vol. 115, no. 12, 2011) discute el modelado por ordenador de una bicapa lipídica del estrato córneo en una fase acuosa. La estructura lipídica incluye ceramidas en configuración de horquilla, colesterol y ácidos grasos, utilizando la colocación aleatoria de moléculas en una cuadrícula con minimización y equilibrio de energía.

Akinshina et al ("Effect of monoglucéridos and fatty acids on a ceramide bilayer", Physical Chemistry Chemical Physics, vol. 18, no. 26, 2016); Das et al ("Simulation studies of stratum corneum lipid mixtures", Biophysical Journal, vol. 97, no.

7, 2009); y MacDermaid et al ("Dehydration of multilamellar fatty acid membranes: Towards a computation model of the stratum corneum", Journal of Chemical Physics, vol. 141, no. 22, 2014) analizan el modelado por ordenador de una matriz lipídica del estrato córneo que comprende ceramidas en configuración de horquilla, ácidos grasos, colesterol y agua. El agua está constituyendo una fase separada.

A la luz de lo anterior, se requieren métodos para una evaluación más precisa de la permeabilidad del estrato córneo a diversos compuestos y/o métodos para estudiar los efectos de los PMA en el estrato córneo.

Compendio

En general, es un objeto de la presente divulgación proporcionar nuevos métodos implementados por ordenador para superar o al menos disipar parcialmente los inconvenientes mencionados anteriormente de los métodos actualmente disponibles.

Es un objeto de la presente descripción proporcionar un nuevo método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo a un compuesto, que podría usarse, por ejemplo, para mejorar la evaluación de la seguridad química y/o la administración de fármacos a través de la piel sin depender de pruebas con animales o métodos estadísticos tal como QSAR. Dicho método puede usarse, por ejemplo, en evaluaciones de toxicidad de diferentes compuestos.

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un nuevo método implementado por ordenador para identificar un PMA para un compuesto que tiene un efecto deseado sobre la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo a dicho compuesto.

Estos y otros objetos que son evidentes para el experto en la presente descripción se cumplen mediante diferentes aspectos de la invención según se reivindica en las reivindicaciones adjuntas y como se describe en general en este documento.

Por lo tanto, en un primer aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para predecir o calcular la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo a un compuesto, como se define en la reivindicación independiente 1.

Se apreciará que los pasos a) y b) del método pueden realizarse en cualquier orden deseado. Varias realizaciones del método se definen en las reivindicaciones dependientes 2-11.

En una realización, el compuesto es un compuesto polar o no polar, tal como un compuesto no polar.

Para aclarar, el número de moléculas de agua por molécula de ceramida indicado en el método reivindicado puede presentarse igualmente como el número de moléculas de agua por molécula de lípido. Por ejemplo, en un sistema con una relación molar de 1:1:1 de ceramida:ácido graso libre:colesterol, una molécula de agua por molécula de ceramida corresponde a una molécula de agua por tres moléculas de lípidos, lo que se puede expresar como 0,3 o 0,33 moléculas de agua por molécula de lípido. Por ejemplo, como se ilustra en la sección Ejemplo a continuación, el sistema de matriz lipídica representado por 33/33/33/75/5/1 que especifica el contenido de moléculas de agua por molécula de ceramida corresponde al sistema 33/33/33/75/5/0,3 especificando el contenido de moléculas de agua por molécula de lípidos. El experto apreciará esta conversión y sabrá cómo aplicarla a otras cantidades de agua no ejemplificadas aquí.

Para aclarar, la frase "menos del 10 % de los ácidos grasos libres están cargados negativamente" se refiere a menos del 10 % del contenido de ácidos grasos libres del modelo como se describe.

Para aclarar, la frase "en donde menos del 10 % de las moléculas de colesterol se reemplazan por moléculas de sulfato de colesterol" se refiere a menos del 10 % del contenido de colesterol del modelo como se describe en este documento. El presente método puede ser útil para la evaluación de la seguridad química y/o la administración de fármacos a través de la piel sin depender de pruebas con animales o métodos estadísticos como QSAR. El presente método aprovecha un modelo mejorado de la matriz lipídica del estrato córneo que proporciona la precisión necesaria, lo que permite mejores resultados de predicción y evaluación. Se apreciará que el método descrito en este documento se puede utilizar para la predicción de la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo a cualquier compuesto siempre que se pueda proporcionar el designador molecular de dicho compuesto. Por lo tanto, el presente método no se limita a ningún grupo de compuestos, tamaño de moléculas o similares.

En este documento, los medios de simulación por ordenador pueden incluir, por ejemplo, un ordenador o una red de ordenadores, cada uno de las cuales incluye una unidad central de procesamiento (CPU) y, por ejemplo, una memoria de almacenamiento (HDD) y una memoria operativa (RAM). Ejemplos de tales medios de simulación por ordenador pueden incluir, por ejemplo, un ordenador independiente en la que se puede ejecutar un código de programa que contiene instrucciones para realizar una simulación requerida. Otros ejemplos pueden incluir, por ejemplo, un grupo de múltiples ordenadores de este tipo. En un grupo de este tipo, los nodos informáticos individuales pueden, por ejemplo, recibir instrucciones para que cada uno realice una parte limitada de la simulación, y los resultados de los nodos individuales

pueden recuperarse y combinarse en una etapa posterior para obtener el resultado de la simulación completa, si la simulación así lo permite. Se prevé que los medios para la simulación por ordenador, tal como se utilizan en este documento, también pueden, o en su lugar, incluir, por ejemplo, una o varias unidades de procesamiento de gráficos (GPU) en las que (al menos parte de) la simulación para cada ordenador o nodo informático puede ejecutarse además de, o en lugar de, en una CPU.

Las ceramidas consisten en un resto esfingoide unido a un ácido graso a través de un enlace amida.

Como se usa en este documento, el término "configuración extendida" en relación con las ceramidas se refiere a una configuración/conformación en donde las cadenas principales de carbono de la fracción de ácido graso y la fracción esfingoide de dichas ceramidas están dispuestas en direcciones sustancialmente opuestas, tal como formando al menos un ángulo de más de 90° entre dichas cadenas, tal como formar al menos un ángulo de más de 120° entre cadenas. En el contexto de la presente divulgación, el término "configuración extendida" en relación con las ceramidas se refiere a la "configuración extendida" de las ceramidas y los términos se usan en este documento de manera intercambiable. El experto en la materia apreciará que la configuración abierta se opone a la configuración de horquilla.

Se apreciará que el presente modelo puede comprender un número opcional de unidades de repetición.

Como se usa en este documento, el término "lípidos totales" se refiere al contenido de lípidos totales de dicho modelo independientemente de la identidad de dichos lípidos.

Como se usa en este documento, el término "ceramidas totales" se refiere al contenido total de ceramidas de dicho modelo independientemente de la identidad de dichas ceramidas.

Como se usa en este documento, el término "O-acilceramidas" abarca todo tipo de O-acilceramidas, incluidas las ceramidas EOS, EOP y EOH.

Como se usa en este documento, el término "no O-acilceramidas" se refiere a cualquier ceramida que no sea O-acilceramidas. Los ejemplos no limitativos de no O-acilceramidas incluyen ceramida AS, ceramida NS, ceramida AP y ceramida NP.

Como se usa en este documento, el término "ácido graso libre" se refiere a ácidos grasos no comprendidos en ceramidas u otros compuestos.

Como se usa en este documento, el término "ácidos grasos libres" abarca ácidos grasos no cargados y desprotonados, es decir, ácidos grasos cargados negativamente. La presente descripción abarca un modelo en donde menos del 10 % de los ácidos grasos libres están cargados negativamente. En una realización del presente método, se proporciona un modelo en donde menos del 10 %, tal como 0-9 %, tal como 0-5 %, tal como 0-2 %, tal como 0 % de los ácidos grasos libres está cargados negativamente.

Como se usa en este documento, la expresión "el colesterol (está) localizado por la fracción de ácido graso de las ceramidas" se refiere a que el colesterol está posicionado más cerca de la fracción de ácido graso de dichas ceramidas que de la fracción esfingoide de dichas ceramidas cuando las ceramidas están en configuración extendida. Por el contrario, la frase "el colesterol (está) localizado por la fracción esfingoide de las ceramidas" se refiere a que el colesterol se coloca más cerca de la fracción esfingoide de dichas ceramidas que de la fracción de ácido graso de dichas ceramidas cuando las ceramidas están extendidas, es decir, desplegadas.

En una realización del presente método, se proporciona un modelo en donde el 25 % de dicho colesterol está localizado en el resto de ácido graso de dichas ceramidas.

En una realización del presente método, se proporciona un modelo en donde el 75 % de dicho colesterol se localiza en el resto esfingoide de dichas ceramidas.

El experto apreciará que, en algunas realizaciones, en donde X % del colesterol está localizado por el resto de ácido graso de dichas ceramidas, 100-X % de dicho colesterol se localiza en el resto esfingoide de las ceramidas. Por ejemplo, en una realización alrededor del 25 % de dicho colesterol está localizado por el resto de ácido graso de dichas ceramidas y alrededor del 75 % de dicho colesterol está localizado por el resto esfingoide de las ceramidas.

Como se usa en este documento, el término "colesterol" abarca tanto el colesterol como el sulfato de colesterol. La presente divulgación abarca un modelo que comprende menos del 10 % de sulfato de colesterol, es decir, menos del 10 % de las moléculas de colesterol pueden ser reemplazadas por moléculas de sulfato de colesterol. En una realización del presente método, se proporciona un modelo en donde menos del 10 %, tal como 0-9 %, tal como 0-5 %, tal como 0-2 %, tal como 0 % de las moléculas de colesterol son reemplazadas por sulfato de colesterol.

En el modelo actualmente divulgado, el % dado se refiere al % de compuesto basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

Como se usa en este documento, el término "modelo" se refiere a las coordenadas moleculares de los componentes del sistema organizados de manera que representan la matriz lipídica del estrato córneo.

5 Debe entenderse que los porcentajes relacionados con la distribución de la longitud de la cadena se refieren a porcentajes de no O-acilceramidas totales y ácidos grasos libres totales, respectivamente. Para ilustrar, por ejemplo, cuando el modelo comprende un 35 % de ceramidas totales, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, y un 1 % de O-acilceramidas, entonces la característica que presenta el 15 % de las no O-acilceramidas en el modelo tienen una longitud de cadena de ácido graso de 21-22 carbonos se debe interpretar como un 15 % de un 35 %. En otras palabras, el 5,25 % del total de moléculas o componentes (sin contar el agua) no son O-acilceramidas que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 21-22 carbonos.

15 En realizaciones particulares, se proporciona un modelo en donde el 0-10 %, tal como el 2-8 %, tal como el 4-6 %, tal como el 5-6 %, tal como el 5,1 % de las no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos o menos; 5-15 %, tal como 7-13 %, tal como 9-11 %, tal como 10-11 %, tal como 10,3 % de no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 21-22 carbonos; 30-50 %, como 35-45 %, como 40-41 %, tal como el 41 % de las no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 23-24 carbonos; 20-40 %, tal como 25-35 %, tal como 29-31 %, tal como el 30,8 % de las no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 25-26 carbonos; 5-15 %, tal como 7-13 %, tal como 9-11 %, tal como 10-11 %, tal como 10,3 % de no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 27-28 carbonos; 0-10 %, tal como 0-5 %, tal como 1-3 %, tal como 2-3 %, tal como 2,5 o 2,6 % de no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 29 carbonos o más.

25 En una realización de dicho modelo, los ácidos grasos libres están presentes en 31-34 %, tal como 32-34 %, tal como 33-34 %, tal como 33 o 34 %, en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua.

En realizaciones particulares, se proporciona un modelo en el que dichos ácidos grasos libres tienen una distribución de longitud de cadena de acuerdo con lo siguiente:

30 0-10 %, tal como 3-7 %, tal como 4-5 %, tal como 4,5 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos o menos; 5-15 %, tal como 7-13 %, tal como 9-10 %, tal como 9,1 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 21-22 carbonos; 30-40 %, tal como 32-36 %, tal como 34-35 %, tal como 34,1 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 23-24 carbonos; 20-40 %, tal como 20-30 %, tal como 25-30 %, tal como 27-28 %, tal como el 27,3 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 25-26 carbonos; 5-15 %, tal como 7-13 %, tal como 9-10 %, tal como 9,1 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 27-28 carbonos; y 0-40 %, tal como 0-30 %, tal como 10-20 %, tal como 15-16 %, tal como 15,9 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 29 carbonos o más.

40 En realizaciones particulares, se proporciona un modelo en el que dichos ácidos grasos libres tienen una distribución de longitud de cadena de acuerdo con lo siguiente

45 4-6 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos; 8-10 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 22 carbonos; 32-36 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 24 carbonos; 25-29 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 26 carbonos; 8-10 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 28 carbonos; y 15-17 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 30 carbonos.

50 En realizaciones particulares, se proporciona un modelo en donde dichos ácidos grasos libres tienen una distribución de longitud de cadena de acuerdo con lo siguiente 4,5% de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos; 9,1 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 22 carbonos; 34,1 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 24 carbonos; 27,3% de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 26 carbonos; 9,1 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 28 carbonos; y 15,9 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 30 carbonos.

55 En una realización de dicho modelo, el colesterol está presente en 31-34 %, tal como 32-34 %, tal como 33-34 %, tal como 33 o 34 %, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua.

60 En una realización de dicho método, se proporciona un modelo en donde dicha unidad repetitiva comprende dos capas de ceramidas extendidas dispuestas con sus cadenas laterales de ácido graso interconectadas entre sí y con sus cadenas laterales esfingoides interconectadas entre sí sobre el límite de la caja periódica. En una realización, dicha al menos una unidad repetitiva se extiende aproximadamente 10 - 12 nm, tal como 10,5 - 11 nm, tal como 10,6 nm en la dirección perpendicular a la superficie de la membrana. En una realización, dicha al menos una unidad repetitiva se extiende aproximadamente 10 - 11,2 nm, tal como 10,1 - 11,2 nm, tal como 10,3 - 11 nm, tal como 10,4 - 10,8 nm, tal como 10,5 - 10,7 nm, tal como 10,6 nm en la dirección perpendicular a la superficie de la membrana.

65 En una realización de dicho método, dicha distancia entre los grupos principales de ceramida a través de la región de la

cadena lateral del ácido graso es de aproximadamente 6,3-6,7 nm, tal como 6,4-6,6 nm, tal como 6,5 nm, y la distancia entre los grupos principales de ceramida a través de la región de la cadena lateral del esfingoide es de aproximadamente 4,3 -4,7 nm, tal como 4,4-4,6 nm, tal como 4,5 nm en la dirección perpendicular a la superficie de la membrana. En una realización particular, se proporciona un modelo en donde la distancia entre los grupos principales de ceramida a través de la región de la cadena lateral del ácido graso es de aproximadamente 6,5 nm y la distancia entre los grupos principales de ceramida a través de la región de la cadena lateral del esfingoide es de aproximadamente 4,5 nm en la dirección perpendicular a la superficie de la membrana.

Como se usa en el mismo, el número de moléculas de agua por molécula de ceramida se refiere al número de moléculas de agua por ceramida de dichas ceramidas totales, en otras palabras, independientemente de la identidad de dicha ceramida.

En una realización del presente método, están presentes 1-2 moléculas de agua por molécula de ceramida. En particular, en una realización, en dicho modelo está presente 1 molécula de agua por molécula de ceramida.

En el presente método, se proporciona un modelo de la matriz lipídica del estrato córneo en donde están presentes 0,2-2 moléculas de agua por molécula de lípido. En una realización, están presentes 0,5-1,3 o 0,3-1,3 moléculas de agua por molécula de lípido.

En una realización, dichas moléculas de agua están incrustadas en la matriz lipídica. Como se usa en este documento, el término "incrustado en la matriz lipídica" significa que dichas moléculas de agua están asociadas con los grupos principales de las ceramidas, ácidos grasos libres y colesterol, en contraste con estar dispuestas en el exterior de la capa o estructura lipídica.

El experto apreciará que la cantidad de moléculas de agua en el modelo de la matriz lipídica del estrato córneo se puede expresar como moléculas de agua por molécula de ceramida o como moléculas de agua por molécula de lípido.

Como se discutió anteriormente, la mayoría de las ceramidas en el presente modelo están dispuestas en una configuración extendida. Por lo tanto, en una realización del presente método, se proporciona un modelo de la matriz lipídica del estrato córneo en donde en dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo aproximadamente el 90-100 %, tal como aproximadamente el 95-100 %, tal como aproximadamente el 98-100 %, tal como aproximadamente 99-100 %, tal como aproximadamente 100 % del total de ceramidas están en configuración extendida.

En una realización del presente método, se proporciona un modelo de la matriz lipídica del estrato córneo que comprende aproximadamente 2-8 % de O-acilceramidas, tal como aproximadamente 5 % de O-acilceramidas, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua. En una realización, dicho modelo comprende aproximadamente 3-8 % de O-acilceramidas basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua. En otra realización, dicho modelo comprende 2-7 % de O-acilceramidas basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua. En una realización del presente método, se proporciona un modelo de matriz lipídica del estrato córneo en donde aproximadamente 1-30 % de las ceramidas totales, tal como aproximadamente 5-20 % de las ceramidas totales, tal como aproximadamente 13-17 %, tal como 13-15 % o 15-17 % de las ceramidas totales son O-acilceramidas en dicho modelo de matriz lipídica del estrato córneo. En una realización, el 15 % de las ceramidas totales son O-acilceramidas en dicho modelo de matriz lipídica del estrato córneo. En una realización, dichas O-acilceramidas se seleccionan de una o más del grupo que consiste en ceramida EOS, ceramida EOP y ceramida EOH. En una realización particular, dichas O-acilceramidas son ceramida EOS y/o EOP.

En una realización de dicho método, se proporciona un modelo en donde la concentración molar de ceramidas totales en dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo es de aproximadamente 30-35 % en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, tal como 33-34 % en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, y en donde el 10-20 % de dichas ceramidas son O-acilceramidas, tal como el 10-15 %, tal como el 11-14 %, tal como el 12 o 13 % de dichas ceramidas son O-acilceramidas. En una realización, el 13-15 % o el 13-17 % de dichas ceramidas son O-acilceramidas. En una realización particular, dicha concentración molar de ceramidas totales es 33-34 % en donde el 13 % de ceramidas totales son O-acilceramidas, por ejemplo, ceramida EOS, EOP y/o EOH. En una realización, dichas O-acilceramidas son EOS, EOP y EOH, en otras palabras, una mezcla de EOS, EOP y EOH. En una realización, dichas O-acilceramidas se seleccionan del grupo que consiste en ceramida EOS y ceramida EOP; ceramida EOS y ceramida EOH; y ceramida EOP y ceramida EOH. En una realización particular, dichas O-acilceramidas son ceramida EOS y EOP, es decir, una mezcla de EOS y EOP. En una realización, dichas O-acilceramidas son ceramida EOS. En una realización, dichas O-acilceramidas son ceramida EOP. En otra realización, dichas O-acilceramidas son ceramida EOH.

El experto en la materia apreciará que se espera que cambios/modificaciones menores en la estructura de las ceramidas comprendidas en el modelo como se describe en el contexto del presente método, cuyos cambios no ejercen ningún efecto significativo sobre las propiedades de dichas ceramidas, se espera que no afecten al presente método. Los ejemplos no limitantes de dichos cambios incluyen la adición de un grupo -OH, el reposicionamiento de un grupo -OH en un átomo de C vecino y el reposicionamiento de un doble enlace en la cadena principal de carbono a los átomos de C vecinos. El experto en la materia es consciente de qué tipo de cambios se espera que no ejerzan ningún efecto significativo

sobre las propiedades de dichas ceramidas. Por lo tanto, la presente descripción abarca métodos en donde el modelo de estrato córneo comprende ceramidas con dichos cambios. Por ejemplo, dichos cambios pueden implicar cambios similares o correspondientes a las diferencias entre la ceramida NP y la ceramida AP o la ceramida EOP y la ceramida EOS mencionadas anteriormente.

En una realización de dicho método como se describe en este documento, se proporciona un modelo en donde dicha no O-acilceramida se selecciona del grupo que consiste en ceramida NP, ceramida NS, ceramida AP y ceramida AS, tal como el grupo que consiste en ceramida NP y ceramida NS o el grupo formado por ceramida AP y ceramida AS. El experto en la materia apreciará que, en el modelo descrito en este documento, las ceramidas pueden combinarse de cualquier forma. Por lo tanto, en una realización, las no O-acilceramidas en el modelo comprenden ceramida NP, ceramida NS, ceramida AP y ceramida AS. En una realización, dicho modelo comprende ceramida NP, ceramida NS y ceramida AS. En una realización, dicho modelo comprende ceramida NP, ceramida NS y ceramida AP. En una realización, dicho modelo comprende ceramida NP, ceramida NS y ceramida AP. En una realización, dicho modelo comprende ceramida NP, ceramida AP y ceramida AS. En una realización, dicho modelo comprende ceramida NS, ceramida AP y ceramida AS. En una realización, dicho modelo comprende ceramida NP y ceramida NS. En una realización, dicho modelo comprende ceramida AP y ceramida AS. En una realización, dicho modelo comprende ceramida NP y ceramida AS. En una realización, dicho modelo comprende ceramida AP y ceramida NS.

En una realización particular de dicho método, se proporciona un modelo en donde dichas no O-acilceramidas tienen una distribución de longitud de cadena aproximada del resto de ácido graso de acuerdo con lo siguiente:

0-15 % de las no O-acilceramidas son ceramidas NP, NS, AP y/o AS que tienen una cadena de ácido graso de 20 carbonos de longitud;

0-15 % de las no O-acilceramidas son ceramidas NP, NS, AP y/o AS que tienen una cadena de ácido graso de 22 carbonos de longitud;

25-50 % de las no O-acilceramidas son ceramidas NP, NS, AP y/o AS que tienen una cadena de ácido graso de 24 carbonos de longitud;

20-50 % de las no O-acilceramidas son ceramidas NP, NS, AP y/o AS que tienen una cadena de ácido graso de 26 carbonos de longitud;

0-15 % de las no O-acilceramidas son ceramidas NP, NS, AP y/o AS que tienen una cadena de ácido graso de 28 carbonos de longitud;

0-10 % de las no O-acilceramidas son ceramidas NP, NS, AP y/o AS que tienen una cadena de ácido graso de 30 carbonos de longitud.

El experto en la materia apreciará que cualquier subconjunto de dichas ceramidas se incluye aquí como se explicó anteriormente. Además, el experto apreciará que las ceramidas con diferentes longitudes de cadena de ácidos grasos pueden estar representadas independientemente entre sí por diferentes subconjuntos de ceramida NP, NS, AP y AS. Por ejemplo, en el modelo descrito en este documento, del 0 al 15 % de las ceramidas que son no O-acilceramidas pueden ser ceramidas NP, NS, AP que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos, mientras que del 25 al 50 % de las no O-acilceramidas pueden ser ceramidas NP y AS que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 24 carbonos.

Para aclarar, en donde las no O-acilceramidas mencionadas son ceramida NP, NS, AP y AS o cualquier subgrupo de las mismas, el porcentaje dado se refiere al porcentaje total de ceramidas NP, NS, AP y AS con la longitud de cadena de ácido graso dada.

En una realización particular, dichas no O-acilceramidas son las ceramidas NP y las ceramidas NS. En otra realización particular, dichas no O-acilceramidas son las ceramidas AP y las ceramidas AS.

En una realización de dicho método, se proporciona un modelo en donde la concentración molar de ácidos grasos libres en dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo es de aproximadamente 30-35 % en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, tal como 32-35 % en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, tal como 33-34 % basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua.

En una realización de dicho método, se proporciona un modelo en donde se cargan del 0 al 2%, por ejemplo, del 0% de los ácidos grasos libres.

En una realización, aproximadamente el 22-28 %, tal como 23-27 %, tal como 24-26 % de dicho colesterol se localiza en la fracción de ácido graso de dichas ceramidas y 78-72 %, tal como el 77-73 %, tal como 76-74 % de dicho colesterol se localiza en el resto esfingoide de las ceramidas. En una realización, aproximadamente el 25 % de dicho colesterol se localiza en el resto de ácido graso de dichas ceramidas y aproximadamente el 75 % de dicho colesterol se localiza en el

resto esfingoide de las ceramidas.

En una realización particular, dicho colesterol localizado por la fracción de ácido graso de dichas ceramidas está dispuesto de manera que su grupo hidroxilo puede formar puentes de hidrógeno con los grupos polares principales de ceramida y su cola está dispuesta en la orientación general de las cadenas laterales esfingoide de ceramida o en la orientación general de las cadenas laterales de ácidos grasos de ceramida, dependiendo de en qué lado del grupo principal de ceramida se encuentre dicho colesterol.

En una realización de dicho método, se proporciona un modelo en donde 0-2 %, tal como 0 % de las moléculas de colesterol se reemplazan por moléculas de sulfato de colesterol.

En otra realización particular de dicho método, se proporciona un modelo en donde la proporción de la concentración molar de ceramidas:ácidos grasos libres:colesterol en dicho modelo de matriz lipídica del estrato córneo es de aproximadamente 1:1:1 en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua. Como se usa en este documento el término "aproximadamente 1:1:1" abarca variantes de la proporción 34:33:33. Así, cualquiera de las ceramidas, ácidos grasos libres y colesterol puede estar presente en un 33-34 % en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, siempre que la concentración molar total de ceramidas, ácidos grasos libres y colesterol sea del 100 %. En una realización particular de dicho método, se proporciona un modelo en donde la proporción de la concentración molar de ceramidas:ácidos grasos libres:colesterol en dicho modelo de matriz lipídica del estrato córneo es de aproximadamente 34:33:33, 33:34:33 o 33:33:34 en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua.

En una realización del presente método, las no O-acilceramidas de dicho modelo son EOS sin ceramida y EOP sin ceramida y EOH sin ceramida.

En una realización del presente método, las ceramidas de dicho modelo son las ceramidas EOS, NS y AS o las ceramidas EOP, NP y AP. En otras realizaciones, las ceramidas pueden ser ceramidas EOP, AP y NS; ceramidas EOP, AS y NP; ceramidas EOS, AP y NP; ceramidas EOP, AS y NS; ceramidas EOS, AP y NS; ceramidas EOS, AS y NP; ceramidas EOS, AS y NP; ceramidas EOS, AP y NS; ceramidas EOP, AS y NS; ceramidas EOS, AP y NP; ceramidas EOP, AS y NP; ceramidas EOP, AP y NS; ceramida EOH, AP y NP; ceramida EOH, AS y NS; ceramida EOH, AP y NS; o ceramida EOH, AS y NP.

En una realización particular de dicho método, se carga el 0 % de los ácidos grasos libres y se reemplaza el 0 % de las moléculas de colesterol por moléculas de sulfato de colesterol.

En una realización particular, dicho modelo de matriz lipídica del estrato córneo comprende lo siguiente:

i) 33-34 % de ceramidas totales en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, de los cuales 95-100 % están en configuración extendida, y en donde el 13 % de dichas ceramidas totales son ceramidas EOS y el 87 % de dichas ceramidas totales son no O-acilceramidas y en donde el resto esfingoide de dichas no O-acilceramidas tiene una longitud de 18 carbonos y el resto de ácido graso de dichas no O-acilceramidas tiene una distribución de longitud de cadena aproximadamente de acuerdo con la siguiente

5,1 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos;
10,3 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 22 carbonos;
20,5 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 24 carbonos;
20,5 % de las no O-acilceramidas son NS de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 24 carbonos;
30,8 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 26 carbonos;
10,3 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 28 carbonos;
y

2,6 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 30 carbonos, y

ii) 33-34 % de ácido graso basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, en donde la distribución de la longitud de la cadena de ácido graso es aproximadamente de acuerdo con lo siguiente:

4,5 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos;

9,1 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 22 carbonos;

34,1 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 24 carbonos;

27,3 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 26 carbonos;

9,1 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 28 carbonos; y

15,9 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 30 carbonos

iii) 33-34 % de colesterol, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, en donde aproximadamente el 25 % de dicho colesterol se localiza en el resto de ácido graso de ceramida de dichas ceramidas y aproximadamente el 75 % de dicho colesterol está localizado por el resto esfingoide de ceramida; y

iv) 1 molécula de agua por molécula de ceramida.

En una realización particular de dicho método, se carga el 0 % de los ácidos grasos libres y se reemplaza el 0 % de las moléculas de colesterol por moléculas de sulfato de colesterol.

Como se usa en este documento, “designadores moleculares” se refiere a propiedades de moléculas que pueden usarse para describir dichas moléculas. Los ejemplos no limitantes de designadores moleculares incluyen coordenadas atómicas y parámetros de campo de fuerza. Por lo tanto, en una realización del método como se describe en este documento, los designadores moleculares proporcionados son coordenadas atómicas; parámetros del campo de fuerza; o coordenadas atómicas y parámetros de campos de fuerza. En particular, dichos parámetros de campo de fuerza pueden ser al menos un parámetro de campo de fuerza seleccionado del grupo que consiste en interacciones no enlazadas e interacciones enlazadas. Las interacciones no enlazadas se pueden seleccionar del grupo que consiste en interacciones de Van der Waals y electrostáticas. Las interacciones enlazadas se pueden seleccionar del grupo que consiste en enlaces, ángulos y ángulos diédricos de un compuesto.

En una realización del método como se describe en este documento, dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo es tal que el coeficiente de permeabilidad calculado $\log K_{Pcalc}$ (en cm/h) calculado para el agua se calcula como se describe en el Ejemplo II. Para aclarar, el presente método inventivo utiliza un modelo que exhibe dicho coeficiente de permeabilidad calculado $\log K_{Pcalc}$ (en cm/h).

En una realización, dicho valor $\log K_{Pcalc}$ es del tiempo de simulación total de 3 μ s. En una realización, dicho valor $\log K_{Pcalc}$ es del tiempo de simulación total de 3 μ s con 30 tirones en cada dirección, tirando a aproximadamente 0,2 nm/ns y con un potencial marco de 15,000 kJ/mol/nm².

El experto en la materia apreciará que el método y el modelo descritos en este documento pueden tener varias aplicaciones en el campo relacionado con la permeabilidad de la piel y sus predicciones. Por ejemplo, puede ser de interés predecir el efecto de una modificación en un compuesto dado, por ejemplo, un candidato a fármaco, sobre la permeabilidad del estrato córneo a dicho compuesto. Se prevé que la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo a un primer compuesto no modificado se compare con la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo a un segundo compuesto modificado. Las modificaciones no limitadas incluyen sustituciones, por ejemplo, sustituciones de un halógeno con un halógeno diferente, cambios de quiralidad, adición o eliminación de un grupo hidroxilo e introducción de enlaces simples, dobles o triples dentro de dicho segundo compuesto. El experto en la materia es consciente de las modificaciones adicionales que se pueden realizar para obtener dicho segundo compuesto.

Debe entenderse que dicho método no se limita a compuestos estructuralmente relacionados, sino que es igualmente aplicable a cualquier primer y segundo compuesto.

La permeabilidad de la piel es difícil de medir tanto in vivo como in vitro. Los experimentos in vivo en humanos son costosos y requieren y pueden requerir la aprobación de un comité de ética. Las mediciones in vitro en piel humana extirpada generalmente se realizan utilizando células de difusión, o células de Franz, generalmente con agua como vehículo, o donante y receptor, pero se pueden usar otros disolventes. Los experimentos generalmente se realizan durante un largo período de tiempo (24 h a 48 h) durante el cual el vehículo se difunde en la piel aumentando la permeabilidad. Se ha demostrado que el estrato córneo hidratado puede aumentar su permeabilidad 10 veces (Idson, 1983 y van der Merwe y Ackermann, 1987). Por lo tanto, se ha propuesto que los datos de las células de difusión pueden no ser representativos de la piel normal y deben evaluarse cuidadosamente (van der Merwe y Ackermann, 1987). Además, cualquier daño a la membrana de la piel, por ejemplo, congelación, aumentaría su permeabilidad. La presente invención proporciona un método para la predicción de la permeabilidad haciendo uso de un modelo de la matriz lipídica del estrato córneo como se describe en este documento. La matriz lipídica es el principal determinante de la permeación. El modelo de matriz lipídica como se define en este documento se proporciona en un estado muy parecido al estado nativo. Por lo tanto, los métodos de predicción que utilizan el presente modelo de acuerdo con los aspectos descritos en este documento proporcionan una alta precisión de predicción.

La permeabilidad del estrato córneo a la mayoría de los compuestos es baja y, por lo tanto, el estrato córneo puede

- suponer un obstáculo para, por ejemplo, administración tópica de fármacos y otros compuestos. Sin embargo, para algunos compuestos la penetración del estrato córneo es indeseable, por ejemplo, en el caso de ciertas toxinas. Por tanto, existe la necesidad de añadir agentes modificadores de la permeabilidad (PMA) a ciertos compuestos o composiciones que comprenden ciertos compuestos para obtener un nivel deseable de permeabilidad de dichos compuestos. Los PMA pueden ser agentes potenciadores de la permeación o agentes reductores de la permeación. Existe la necesidad en el campo de poder predecir la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo en presencia de al menos un agente modificador de la permeabilidad química (PMA) a un compuesto. Tales predicciones pueden ser beneficiosas durante el desarrollo de fármacos y/o composiciones farmacéuticas con propiedades de permeabilidad deseadas. La capacidad de predecir la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo en presencia de al menos un agente modificador de la permeabilidad química (PMA) a un compuesto permite una identificación y desarrollo más rápidos y menos costosos de fármacos candidatos y composiciones farmacéuticas para administración tópica, tal como administración tópica en la piel. Ventajosamente, se puede estudiar tanto el efecto sobre la permeabilidad del sistema, así como cómo afecta el PMA al sistema.
- Además, el alcance de la presente divulgación abarca un método para predecir el efecto de al menos un PMA en la organización de una matriz lipídica del estrato córneo. Por ejemplo, el método permite predicciones, tal como si dicho PMA forma poros en la matriz lipídica, forma vesículas o distorsiona el empaquetamiento de la cadena lipídica en general, en base a dichas simulaciones moleculares. La predicción y comprensión del efecto ejercido por al menos un PMA sobre la organización molecular se considera útil, por ejemplo, clasificación de PMA y posiblemente para que las autoridades reguladoras mejoren la evaluación de las formulaciones y su efecto.
- Por lo tanto, en un segundo aspecto, se proporciona un método implementado por ordenador para predecir el efecto de al menos un PMA en la organización de una matriz lipídica del estrato córneo, tal como se define en la reivindicación independiente 12.
- Nuevamente, el orden de ejecución de los pasos de este método puede ser diferente. Por ejemplo, los pasos a) y b) se pueden realizar en cualquier orden.
- Un PMA puede conducir a, por ejemplo, formación de poros, vesículas o alteraciones en los restos lipídicos de las ceramidas de dicho modelo de matriz lipídica del estrato córneo.
- El resultado del método de predicción proporciona información sobre la organización de dicha matriz lipídica del estrato córneo en presencia del PMA. Los ejemplos no limitativos de dicha organización incluyen la formación de poros en la matriz lipídica y/o la formación de vesículas que distorsionan el empaquetamiento de las cadenas lipídicas. El efecto predicho de dicho PMA se puede usar para encontrar uno o más PMA candidatos para la modificación (aumento o disminución) de la permeabilidad del estrato córneo a un compuesto o grupo de compuestos de interés. El uso de agua como PMA también permitirá estudiar los efectos de hidratación de la piel y encontrar un nivel de hidratación que dé valores de permeabilidad similares a los obtenidos por métodos *in vitro*.
- Se apreciará que la identificación de un PMA adecuado para un compuesto de interés es importante, por ejemplo, en el campo del desarrollo de fármacos, el desarrollo de cosméticos y el desarrollo de composiciones para usos farmacéuticos o cosméticos y desarrollo de composiciones que contengan compuestos nocivos y/o tóxicos, por mencionar algunos. Un método que permite identificar un PMA para un compuesto que tiene un efecto deseado sobre la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo a dicho compuesto es útil y puede mejorar y acortar el tiempo de desarrollo y/o investigación de las composiciones y disminuir el costo asociado con dicho desarrollo, por ejemplo, disminuyendo el número de experimentos *in vivo* necesarios.
- En el contexto de los aspectos mencionados anteriormente, las simulaciones por ordenador utilizadas comprenden, por ejemplo, simulaciones de Dinámica Molecular (Alder y Wainwright, 1959). El experto en la materia apreciará que se pueden usar otros métodos informáticos y/o de simulación sin apartarse del alcance de la presente descripción.
- Además, en el contexto de la presente divulgación y en las realizaciones de los aspectos relacionados con el PMA (incluido el aspecto 2), el PMA puede ser un agente potenciador de la permeabilidad o un agente reductor de la permeabilidad. Por ejemplo, puede ser un agente potenciador de la permeabilidad, tal como un agente potenciador de la permeabilidad química. Los ejemplos no limitantes de dichos PMA incluyen agua; sulfóxidos y compuestos relacionados, tales como dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); azona y derivados de la misma; pirrolidonas, tales como N-metil-2-pirrolidona (NMP) y 2-pirrolidona (2P); ácidos grasos, tales como el ácido oleico; alcoholes y glicoles, tales como etanol; análogos de urea, tales como urea cíclica; aceites esenciales, terpenos y terpenoides, tales como aceite de eucalipto, l-mentol y d-limoneno; y sesquiterpeno. Además, PMA en este contexto puede ser ácidos grasos libres y/o ceramidas adicionales que se agregan a las composiciones, tales como las composiciones cosméticas. Se espera que dichos compuestos afecten a la organización de la matriz lipídica del estrato córneo de una forma que afecte a la permeabilidad de dicha matriz lipídica del estrato córneo a un compuesto de interés.
- Así, en una realización de dichos aspectos, dicho PMA se selecciona del grupo que consiste en agua: sulfóxidos y compuestos relacionados, tales como dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); azona y derivados de la misma; pirrolidonas, tal como N-metil-2-pirrolidona (NMP) y 2-pirrolidona (2P); ácidos grasos, tal como el ácido oleico; alcoholes

y glicoles, tales como etanol; análogos de urea, tales como urea cíclica; aceites esenciales, terpenos y terpenoides, tales como aceite de eucalipto, l-mentol y d-limoneno; sesquiterpeno, ácidos grasos libres y ceramidas, tal como el grupo formado por el agua: sulfóxidos y compuestos relacionados, como dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); azona y derivados de la misma; pirrolidonas, tales como N-metil-2-pirrolidona (NMP) y 2-pirrolidona (2P); ácidos grasos, tal como el ácido oleico; alcoholes y glicoles, tal como etanol; análogos de urea, tales como urea cíclica; aceites esenciales, terpenos y terpenoides, tales como aceite de eucalipto, l-mentol y d-limoneno; y sesquiterpeno. En una realización particular, dicho PMA se selecciona del grupo que consiste en azona, DMSO, etanol y agua.

Se apreciará que abarcados por la presente divulgación también están los usos del modelo de la matriz lipídica del estrato córneo como se define en la reivindicación independiente 13.

También están incluidos los productos de programas informáticos como se define en la reivindicación independiente 14.

También se incluye un medio legible por ordenador que lleva un código de programa informático como se define en la reivindicación independiente 15.

Si bien la invención se ha descrito con referencia a varios ejemplos de aspectos y realizaciones, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar varios cambios y se pueden sustituir elementos de la misma por equivalentes sin apartarse del alcance de la invención. Además, se pueden realizar muchas modificaciones para adaptar una situación o molécula particular a las enseñanzas de la invención sin apartarse del alcance esencial de la misma. Por lo tanto, se pretende que la invención no se limite a ninguna realización particular contemplada, sino que la invención incluirá todas las realizaciones que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1a-f ilustran fórmulas estructurales para compuestos incluidos en un modelo de matriz lipídica del estrato córneo; Las Figuras 2a-g ilustran los perfiles de intensidad de CEMOVIS experimentales y los perfiles de intensidad calculados de acuerdo con un método de la presente divulgación, utilizando un modelo con un número variable de moléculas de agua por ceramida;

Las Figuras 3a-h ilustran los perfiles de intensidad de CEMOVIS experimentales y los perfiles de intensidad calculados de acuerdo con un método de la presente descripción, utilizando un modelo con una cantidad variable de colesterol asociado con las cadenas de esfinguido de ceramida;

Las Figuras 4a-h ilustran perfiles de intensidad de CEMOVIS experimentales y perfiles de intensidad calculados de acuerdo con un método de la presente descripción, usando un modelo con concentración relativa variable de ceramidas;

Las Figuras 5a-f ilustran perfiles de intensidad de CEMOVIS experimentales y perfiles de intensidad calculados de acuerdo con un método de la presente descripción, utilizando un modelo con concentración relativa variable de ácido graso libre;

Las Figuras 6a-g ilustran perfiles de intensidad de CEMOVIS experimentales y perfiles de intensidad calculados de acuerdo con un método de la presente descripción, usando un modelo con concentración relativa variable de colesterol;

Las Figuras 7a-g ilustran los perfiles de intensidad de CEMOVIS experimentales y los perfiles de intensidad calculados de acuerdo con un método de la presente divulgación, usando un modelo con una concentración total variable de ceramida EOS;

Las Figuras 8a-d ilustran vistas superiores de ceramidas, colesterol, ácidos grasos libres y agua, respectivamente, en una matriz lipídica del estrato córneo antes de la simulación por ordenador;

Las Figuras 9a-d ilustran vistas laterales de ceramidas, colesterol, ácidos grasos libres y agua, respectivamente, en una matriz lipídica del estrato córneo antes de la simulación por ordenador;

Las Figuras 10a-d ilustran vistas laterales de ceramidas, colesterol, ácidos grasos libres y agua, respectivamente, en un modelo de matriz lipídica del estrato córneo de acuerdo con un método de la presente divulgación;

Las Figuras 11a-e ilustran los agentes modificadores de la permeabilidad azona, DMSO, ácido oleico, ácido esteárico y agua, respectivamente, y su organización dentro de un modelo de matriz lipídica del estrato córneo de acuerdo con un método de la presente divulgación; y

Las Figuras 12a-b ilustran de forma esquemática y muy simplificada un producto de programa informático y un medio legible por ordenador de acuerdo con la invención.

Ejemplos

Compendio

Los siguientes ejemplos describen detalles específicos sobre cómo llevar a cabo métodos según la presente divulgación para calcular, por ejemplo, la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo a diversos compuestos.

5 Como requisito previo, se necesitan parámetros de campo de fuerza (parámetros de interacción) para las moléculas utilizadas en las simulaciones MD. Las descripciones de la mayoría de estos compuestos/moléculas se pueden encontrar en campos de fuerza bioquímicos comunes, tales como, por ejemplo, el campo de fuerza de lípidos CHARMM36 (Klauda et al., 2010; Venable et al., 2014), con modificaciones como se puede ver en las Tablas 1-6. Los parámetros de interacción de los permeantes pueden obtenerse usando, por ejemplo, STaGE (Lundborg y Lindahl, 2014), que a su vez utiliza Open Babel (O'Boyle et al., 2011) y MATCH (Yesselman et al., 2012) para generar parámetros de campo de fuerza a partir de un conjunto de coordenadas atómicas, y/o enlaces covalentes, para moléculas orgánicas genéricas.

Para un sistema de estrato córneo (es decir, una matriz lipídica de estrato córneo) como se describe en este documento, pueden ser necesarios los siguientes componentes:

- 15 - No O-acilceramidas, incluyendo:
 - o Ceramida NP con cadena esfingioide C18 y cadena de ácido graso en el siguiente rango: C20, C22, C24, C26, C28 y C30. Los parámetros de ceramida NP pueden basarse en ceramida NS con parámetros de grupo principales optimizados para mejorar la concordancia con los escaneos de torsión mecánicos cuánticos y los datos de estructura cristalina de ceramida NP; y o Ceramida NS con cadena esfingioide C18 y cadena de ácido graso C24. Los parámetros del grupo principal de ceramida NP que se modificaron y eran similares en ceramida NS pueden transferirse de ceramida NP,
- 20 - O-acilceramidas, incluyendo Ceramida EOS con parámetros basados en los parámetros NS de ceramida (incluidas las modificaciones del grupo principal) y con parámetros CHARMM36 básicos para el grupo éster introducido y las instauraciones;
- 25 - Ácidos grasos libres saturados en el siguiente rango: C20, C22, C24, C26, C28 y C30;
- 30 - Colesterol, y
- Agua, basada en, por ejemplo, el modelo de agua TIP3P.

La Figura 1a ilustra una fórmula estructural para el colesterol, la Figura 1b ilustra una fórmula estructural para los ácidos grasos libres, la Figura 1c ilustra una fórmula estructural para la ceramida NP, la Figura 1d ilustra una fórmula estructural para la ceramida NS y la Figura 1e ilustra una fórmula estructural para la ceramida EOS. La Figura 1f ilustra el grupo principal de ceramida NP y los átomos están numerados como referencia a las Tablas 1-6, que muestran qué parámetros CHARMM36 se agregaron o modificaron para ejecutar simulaciones con ceramida NP.

40 Tabla 1. Parámetros de interacción de pares de átomos CHARMM36 modificados para ceramida NP. Los números de átomo corresponden a los números de átomo en la Figura 1f y los tipos de átomo CHARMM36 se dan entre paréntesis.

Átomo 1	Átomo 2	σ (nm)	ξ (kJ/mol)
12 (O)	17, 18, 25, 23, 24 (HAL2)	0,22500	0,47500
14, 15, 16 (OHL)	17, 18, 25, 23, 24 (HAL2)	0,22500	0,47500
14, 15, 16 (OHL)	26, 27, 28 (OHL)	0,132726	0,1108657

Tabla 2. Parámetros de enlace CHARMM36 modificados para ceramida NP. Los números de átomo corresponden a los números de átomo en la Figura 1f y los tipos de átomo CHARMM36 se dan entre paréntesis.

Átomo 1	Átomo 2	b_0 (nm)	k_b (kJ/mol/nm ²)
7 (CTO1)	8 (CTO1)	0,15000	1,86188e+05

45 Tabla 3. Parámetros de ángulo CHARMM36 modificados para ceramida NP. Los números de átomo corresponden a los números de átomo en la Figura 1f y los tipos de átomo CHARMM36 se dan entre paréntesis.

Átomo 1	Átomo 2	Átomo 3	Θ_0 (grados)	k_Θ (kJ/mol/rad ²)	r_{13} (nm)	k_{UB} (kJ/mol/nm ²)
1 (C)	2 (CTL2)	3 (CTL2)	115,00	435,1360	0,0000	0,0000
1 (C)	5 (NHL)	6 (CTL1)	121,00	500,0000	0,0000	0,0000
1 (C)	5 (NHL)	19 (H)	121,00	284,5120	0,0000	0,0000

5 (NHL)	6 (CTL1)	13 (CTO2)	111,08	585,7600	0,0000	0,0000
7 (CTO1)	6 (CTL1)	13 (CTO2)	114,88	488,2728	0,2561	9,33869e+03
6 (CTL1)	7 (CTO1)	8 (OHL)	114,88	435,1360	0,0000	0,0000
6 (CTL1)	7 (CTO1)	15 (OHL)	111,09	585,7600	0,0000	0,0000
8 (CTO1)	7 (CTO1)	15 (OHL)	110,10	520,0000	0,0000	0,0000
8 (CTO1)	7 (CTO1)	21 (HAL1)	110,10	288,6960	0,2179	1,88531e+04
7 (CTO1)	8 (CTO1)	9 (CTL2)	113,50	488,2728	0,2561	9,33869e+03
7 (CTO1)	8 (CTO1)	16 (OHL)	110,10	520,0000	0,0000	0,0000
9 (CTL2)	8 (CTO1)	16 (OHL)	110,10	633,4576	0,0000	0,0000
9 (CTL2)	8 (CTO1)	22 (HAL1)	110,10	288,6960	0,2179	1,88531e+04
8 (CTO1)	9 (CTL2)	10 (CTL2)	113,50	488,2728	0,2561	9,33869e+03
8 (CTO1)	9 (CTL2)	23 (HAL2)	110,10	221,7520	0,2179	1,88531e+04
6 (CTL1)	13 (CTO2)	14 (OHL)	113,50	633,4576	0,0000	0,0000

Tabla 4. Parámetros de torsión adecuados CHARMM36 modificados para ceramida NP. Los números de átomo corresponden a los números de átomo en la Figura 1f y los tipos de átomo CHARMM36 se dan entre paréntesis.

Átomo 1	Átomo 2	Átomo 3	Átomo 4	θ_s (grados)	k_θ (kJ/mol)	Multiplicidad
5 (NHL)	1 (C)	2 (CTL2)	3 (CTL2)	0,000	1,400	1
5 (NHL)	1 (C)	2 (CTL2)	3 (CTL2)	180,0	0,400	2
5 (NHL)	1 (C)	2 (CTL2)	3 (CTL2)	0,000	0,550	3
5 (NHL)	1 (C)	2 (CTL2)	3 (CTL2)	180,0	0,350	6
12 (O)	1 (C)	2 (CTL2)	3 (CTL2)	180,0	1,000	1
12 (O)	1 (C)	2 (CTL2)	3 (CTL2)	0,000	0,500	3
18 (HAL2)	2 (CTL2)	3 (CTL2)	17 (HAL2)	0,000	0,000	3
1 (C)	5 (NHL)	6 (CTL1)	7 (CTO1)	0,000	13,00	1
1 (C)	5 (NHL)	6 (CTL1)	7 (CTO1)	180,0	9,000	2
1 (C)	5 (NHL)	6 (CTL1)	7 (CTO1)	180,0	6,500	3
1 (C)	5 (NHL)	6 (CTL1)	13 (CTO2)	0,000	12,00	1
1 (C)	5 (NHL)	6 (CTL1)	13 (CTO2)	180,0	5,500	2
1 (C)	5 (NHL)	6 (CTL1)	13 (CTO2)	180,0	4,000	3
5 (NHL)	6 (CTL1)	7 (CTO1)	15 (OHL)	180,0	15,50	2
5 (NHL)	6 (CTL1)	7 (CTO1)	15 (OHL)	0,000	6,000	3
5 (NHL)	6 (CTL1)	7 (CTO1)	8 (CTO1)	180,0	5,500	2
5 (NHL)	6 (CTL1)	7 (CTO1)	8 (CTO1)	0,000	7,500	3
5 (NHL)	6 (CTL1)	13 (CTO2)	14 (OHL)	0,000	7,000	1
5 (NHL)	6 (CTL1)	13 (CTO2)	14 (OHL)	180,0	8,500	2
5 (NHL)	6 (CTL1)	13 (CTO2)	14 (OHL)	0,000	5,500	3
15 (OHL)	7 (CTO1)	8 (CTO1)	16 (OHL)	180,0	8,000	1
15 (OHL)	7 (CTO1)	8 (CTO1)	16 (OHL)	0,000	3,000	3
15 (OHL)	7 (CTO1)	8 (CTO1)	9 (CTL2)	0,000	8,000	1
15 (OHL)	7 (CTO1)	8 (CTO1)	9 (CTL2)	0,000	0,900	3

7 (CTO1)	8 (CTO1)	9 (CTL2)	10 (CTL2)	180,0	0,800	1
7 (CTO1)	8 (CTO1)	9 (CTL2)	10 (CTL2)	180,0	3,200	2
7 (CTO1)	8 (CTO1)	9 (CTL2)	10 (CTL2)	0,000	1,000	3
16 (OHL)	8 (CTO1)	9 (CTL2)	10 (CTL2)	0,000	0,000	3
22 (HAL2)	8 (CTO1)	9 (CTL2)	10 (CTL2)	0,000	0,000	3
22 (HAL2)	8 (CTO1)	9 (CTL2)	23 (HAL2)	0,000	0,000	3
7 (CTO1)	8 (CTO1)	16 (OHL)	28 (HOL)	0,000	0,000	3
9 (CTL2)	8 (CTO1)	16 (OHL)	28 (HOL)	0,000	0,000	3

Tabla 5. Parámetros de torsión no adecuados CHARMM36 modificados para ceramida NP. Los números de átomo corresponden a los números de átomo en la Figura 1f y los tipos de átomo CHARMM36 se dan entre paréntesis.

Átomo 1	Átomo 2	Átomo 3	Átomo 4	ξ_0 (grados)	k_ξ (kJ/mol/rad ²)
5 (NHL)	1 (C)	6 (CTL1)	19 (H)	0,000	40,00
1 (C)	2 (CTL2)	5 (NHL)	12 (O)	0,000	40,00

- 5 Tabla 6. Parámetros de exclusión CHARMM36 modificados para ceramida NP. Los números de átomo corresponden a los números de átomo en la Figura 1f y los tipos de átomo CHARMM36 se dan entre paréntesis. Las interacciones no enlazadas entre el átomo 1 y los átomos de exclusión enumerados se ignoran.

Átomo 1	Átomos de exclusión
21 (HAL1)	22 (HAL1)
15 (OHL)	28 (HOL)
27 (HOL)	16 (OHL), 28 (HOL)
18 (HAL2)	19 (H)
12 (O)	15 (OHL), 27 (HOL)

- 10 Además, pueden ser necesarias las coordenadas atómicas de los componentes de la membrana en una conformación extendida para construir la estructura inicial del modelo de matriz lipídica. Las moléculas no tienen que estar en una conformación energéticamente favorable desde el principio.

Para generar el modelo de matriz lipídica del estrato córneo, se pueden realizar los siguientes pasos:

- 15 1) Generación de una matriz vacía con dos capas. El tamaño de la matriz vacía puede, por ejemplo, ser 10 x 10 (dimensión X por Y, con la dimensión Z perpendicular a la matriz), y la matriz puede estar llena de ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres de acuerdo con sus respectivas concentraciones. Cada capa de la matriz se puede dividir en dos regiones o partes, donde una parte (denominada región de ácidos grasos de ceramida) puede contener los restos de ácidos grasos de ceramida, ácidos grasos libres y colesterol, y la otra parte (denominada región esfingoides de ceramida) puede contener restos de esfingoides de ceramida y colesterol. La siguiente capa se puede construir de manera similar, con la región de ácido graso de ceramida en interfaz con la región de ácido graso de ceramida en la primera capa. Un ejemplo del llenado de la matriz se ilustra en las Figuras 8a-d y las Figuras 9a-d. Las Figuras 8 a-d ilustran vistas superiores de la matriz llena de ceramidas, colesterol, ácidos grasos libres y agua, respectivamente. Las Figuras 9a-d ilustran vistas laterales correspondientes de la matriz;
- 25 2) Generación de una caja periódica alrededor del sistema con una distancia mínima a los átomos que sea lo suficientemente grande para evitar que los átomos choquen sobre el límite de la caja periódica, y
- 30 3) Adición de agua al sistema. El agua se puede colocar cerca del grupo principal (0,3-0,5 nm) pero preferiblemente no más cerca de 0,06 nm del borde de la caja periódica.

Se pueden ejecutar simulaciones MD del modelo de matriz lipídica, utilizando, por ejemplo, GROMACS (Pronk et al., 2013; Abraham et al., 2015), y pueden incluir los siguientes pasos:

- 35 1) Minimización de energía con configuraciones de interacción de largo alcance apropiadas para el campo de fuerza elegido. Las simulaciones pueden ejecutarse, por ejemplo, utilizando un integrador de descenso más pronunciado para 5000 pasos y una tolerancia de 10,0 kJ/mol/nm;

2) Equilibrio comenzando con un conjunto NVT seguido de un conjunto NPT, comenzando con restricciones que se pueden bajar y luego quitar en pasos durante los pasos de equilibrio. El equilibrio puede continuar durante al menos 250 ns, y

3) Se puede ejecutar un paso final, denominado producción (también en el conjunto NPT), durante el cual, por ejemplo, se puede medir el tamaño del sistema. Este paso se puede ejecutar, por ejemplo, por 100 ns adicionales.

Para calcular la permeabilidad del modelo de matriz lipídica a un compuesto orgánico genérico, se pueden realizar los siguientes pasos:

1) Cálculo de la energía libre de hidratación (energía libre de solvatación en agua) del compuesto;

2) Cálculo de la energía libre de solvatación del compuesto en la matriz lipídica (la energía libre de una conformación que podría considerarse unida a la membrana) en la interfase entre las cadenas esfingoide de ceramida;

3) Inserción de dos copias del compuesto/molécula en el modelo de matriz lipídica equilibrada (por ejemplo, después de la fase de producción de 100 ns), una en la interfaz entre las cadenas esfingoide de ceramida y otra en la interfaz entre las cadenas de ácidos grasos de ceramida. Las copias del compuesto/molécula pueden insertarse en posiciones aleatorias en el plano X/Y;

4) Equilibrio del sistema con las copias insertadas del compuesto/molécula durante, por ejemplo, 1 ns;

5) A partir del sistema equilibrado, ejecución de dos simulaciones tirando de ambas copias del compuesto/molécula en la misma dirección en la dirección Z positiva y negativa, respectivamente (referidas como tirando hacia adelante y hacia atrás);

6) Repetición de los pasos 3-5 para lograr suficiente tiempo total de simulación; y

7) Cálculo del potencial de fuerza media (PMF, utilizando la diferencia de energía libre del compuesto en la matriz lipídica y la energía libre de hidratación como punto cero) y coeficiente de difusión local en todo el sistema (en la dirección Z), y, a partir de ello, el cálculo de la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo al compuesto/molécula. Esto se puede hacer, por ejemplo, por una secuencia de comandos Python usando una versión ponderada del teorema de fluctuación de Crooks (Crooks, 1999; Crooks, 2000; Kosztin et al, 2006; Forney et al., 2008; Chen, 2008; y Park y Schulten, 2004). El promedio, o el promedio ponderado de Boltzmann, de por ejemplo, 3 cálculos separados de energía libre de hidratación 1) se pueden usar al calcular el punto cero para el PMF, o la energía libre de inserción. El promedio, o el promedio ponderado de Boltzmann, de por ejemplo, 4 a 6 cálculos separados de energía libre de solvatación 2) se pueden usar al calcular el punto cero para el PMF.

La permeabilidad también se puede calcular de diferentes maneras, además de las simulaciones MD de no equilibrio descritas anteriormente, como por muestreo de marco, analizadas usando WHAM (Kumar, 1992) o MBAR (Shirts y Chodera, 2008), o el histograma de peso acelerado (AWH) (Lindahl et al., 2014).

Si se utiliza un muestreo de marco, el primer paso puede ser generar conformaciones iniciales sobre la coordenada de reacción (por ejemplo, a lo largo de la normal de la matriz lipídica), por ejemplo, tirando de un permeante, usando, por ejemplo, un potencial marco en movimiento, a través de una tasa constante y coordenadas de escritura, que se utilizan como posiciones de partida en el siguiente paso, a intervalos regulares. En el siguiente paso, se puede iniciar una simulación desde cada una de las posiciones iniciales (resultados del paso anterior) y un potencial marco puede estar restringiendo la posición del permeante y la fuerza requerida para mantenerlo en su lugar se puede usar para calcular el PMF y el coeficiente de difusión local.

El método AWH (Lindahl et al., 2014) es una técnica de conjunto extendida que aplica un sesgo adaptativo para explorar una coordenada de reacción (las posiciones del permeante a lo largo de la normal de la matriz lipídica).

También se prevé que el flujo (J) pueda usarse como una medida alternativa de permeabilidad, y dado por $J = PC_{\text{donante}}$ donde C_{donante} es la concentración del compuesto en el compartimiento donante y donde P es el coeficiente de permeabilidad. La concentración C_{donante} se puede mantener preferiblemente en, o cerca de, la solubilidad del compuesto.

Para simular cómo un agente modificador de la permeación (PMA), o una combinación de múltiples agentes, afecta la matriz lipídica del estrato córneo, se pueden realizar los siguientes pasos:

1) A partir del sistema de matriz lipídica equilibrada (por ejemplo, la estructura de salida después de la fase de producción de 100 ns), la inserción de la concentración deseada de PMA, por ejemplo, 0,25-8 moléculas de PMA por molécula de ceramida, y

2) Minimización de energía y equilibrio del sistema, por ejemplo, de acuerdo con los pasos 1 a 3 como se describe anteriormente para ejecutar las simulaciones MD.

Para calcular la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo con un PMA a un compuesto orgánico/molécula genérica, se pueden seguir los pasos 2 a 7 descritos anteriormente para calcular la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo a un compuesto/molécula orgánica genérica, pero utilizando el sistema equilibrado con el PMA insertado en la matriz lipídica del estrato córneo como entrada en el paso 3.

Sugerir si se puede usar un PMA específico para modificar la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo a un compuesto específico, se puede calcular el PMF a lo largo de la normal de la bicapa lipídica apilada y el coeficiente de difusión local de un permeante a través de la matriz lipídica del estrato córneo. El pico más alto en el PMF puede mostrar dónde, a través del sistema de lípidos, se encuentra la parte del sistema que limita la permeación, lo que permite decidir si un PMA que interactúa principalmente con el grupo principal o las colas de lípidos sería más útil para modificar la permeabilidad de la matriz lipídica al compuesto específico.

Ejemplo I

Configuración del sistema

Se generó un modelo de la matriz lipídica del estrato córneo utilizando una secuencia de comandos Python. El sistema se generó como dos capas, cada una de las cuales se dividió en una matriz 10 x 10. Se calculó el número de moléculas de cada tipo para acercarse lo más posible a la distribución deseada de ceramidas (incluida la ceramida EOS), ácidos grasos libres y colesterol. Si los porcentajes solicitados de todas las moléculas no se podían distribuir exactamente, las moléculas se agregaban y/o eliminaban al azar para estar lo más cerca posible de la proporción deseada. Las moléculas utilizadas para construir el sistema estaban en una configuración recta extendida (es decir, no se utilizaron ceramidas en una configuración de horquilla). Cada punto de la matriz, que representa una de las capas lipídicas, podría llenarse con una molécula de tipo ceramida, expandiéndose a lo largo de toda la capa de la matriz, o por una molécula más corta, ácido graso o colesterol colocado en la región de la cadena de ácidos grasos (más cerca del centro de la membrana del modelo construido) y/o un colesterol en la región de la cadena del esfingoide. La siguiente capa se llenó tratando de hacer coincidir moléculas con cadenas largas en la región de ácidos grasos con moléculas con cadenas cortas para comenzar con un sistema con espacios tan pequeños como sea posible entre las moléculas. La distancia entre las dos capas se estableció para evitar colisiones.

Las moléculas de agua se agregaron mediante una secuencia de comandos que ejecutaba iterativamente el comando solvato gmx y, después de eso, eliminaba las moléculas de agua lejos del grupo principal y cerca de los bordes de la caja periódica. La iteración se ejecutó aumentando la distancia desde el grupo principal hasta que se agregó el número deseado de moléculas de agua. Si se añadían más moléculas de agua de las que se habían solicitado, se eliminaban moléculas de agua al azar.

Simulaciones

Los modelos de la matriz lipídica del estrato córneo se evaluaron utilizando simulaciones MD, empleando GROMACS y el campo de fuerza lipídica CHARMM36. Los parámetros de las ceramidas NP se basaron en los tipos de átomos de las ceramidas NS 24:0 y CHARMM36 y los parámetros enlazados y luego se optimizaron para reproducir escaneos de torsión mecánica cuántica y una estructura cristalina publicada de ceramidas NP 24:18 (Dahlén y Pascher, 1979).

Se utilizó un esquema de corte de Verlet actualizando la lista de pares cada 20 pasos (cambiado automáticamente a 40 pasos) con una distancia de corte de 1,2 nm. Las interacciones de Van der Waals se cortaron a 1,2 nm con un cambio de fuerza suave de 1,0 nm a 1,2 nm. Si es posible, la mayoría de las simulaciones se realizaron sin una corrección de dispersión de energía y presión para compensar las interacciones fuera del límite. Las interacciones de Coulomb se calcularon utilizando PME (Essmann et al., 1995) con un radio de 1,2 nm. Los enlaces de hidrógeno se restringieron utilizando el algoritmo P-LINCS (Hess et al., 1997; Miyamoto et al., 1992). Se utilizaron parámetros TIP3P (Jorgensen et al., 1983) para moléculas de agua.

Las minimizaciones de energía se realizaron utilizando un integrador de descenso más pronunciado sin enlaces restringidos para 5000 pasos y una tolerancia de 10,0 kJ/mol/nm. Los átomos pesados fueron restringidos a sus posiciones originales por una fuerza de 100 kJ/mol/nm².

Los equilibrios se realizaron en cinco etapas diferentes, la primera de las cuales en el conjunto NVT y la siguiente en el conjunto NPT con acoplamiento de presión semiisotrópica de 1 bar usando un barostato Berendsen (Berendsen et al., 1984) con una constante de acoplamiento de 5 ps y una compresibilidad de 4,5e⁻⁵ bar⁻¹. La temperatura se fijó en 303,15 K utilizando un termostato de reescalado de velocidad (Bussi et al., 2007) con una constante de acoplamiento de 1 ps. En la primera etapa de equilibrio, los átomos pesados aún estaban sujetos a sus posiciones iniciales por una fuerza de 100 kJ/mol/nm². En las siguientes etapas, las restricciones no se aplicaron a los átomos del grupo principal (heteroátomos o átomos de carbono que se unen a heteroátomos) de las ceramidas y las fuerzas de restricción sobre las ceramidas se redujeron a 10 y 2 kJ/mol/nm² en la tercera y cuarta etapas de equilibrio respectivamente, aun manteniendo los ácidos grasos y el colesterol restringidos por una fuerza de 100 kJ/mol/nm². En la última etapa de equilibrio, no se aplicaron restricciones. El tamaño de paso MD se eligió como 0,25 fs/paso durante la primera etapa de equilibrio de 5 ps. Después

de eso, el tamaño del paso se eligió como 2 fs/paso y el tiempo total de equilibrio fue de aproximadamente 270 ns, de los cuales 250 ns fueron sin restricciones. Se eliminó el centro de movimiento de masas de todo el sistema.

5 Las corridas de producción fueron las mismas que en la última etapa de equilibrio, excepto que se empleó un barostato Parrinello-Rahman (Parrinello y Rahman, 1981) con una constante de acoplamiento de 15 ps y la longitud de la simulación fue de 100 ns.

10 Se realizaron simulaciones para matrices lipídicas del estrato córneo que tenían diversas composiciones lipídicas, diversas distribuciones de colesterol sobre la estructura bicapa, diversas distribuciones de longitudes de cadena lipídica, diversas cantidades relativas de fitoesfingosina y ceramidas basadas en esfingosina, y diversos números finitos de moléculas de agua asociadas con los grupos principales de lípidos. En este documento, las diferentes matrices lipídicas se identificarán utilizando la notación A/B/C/D/E/F, donde A, B y C denotan la concentración molar relativa, sin incluir el agua, de ceramidas (incluidas las no O-acilceramidas y O-acilceramidas), colesterol y ácidos grasos libres respectivamente, donde D indica la cantidad relativa de colesterol ubicado en/asociado con las cadenas esfingoides de ceramida, donde E indica la concentración molar total de O-acilceramida (por ejemplo, ceramida EOS), sin incluir el agua, y donde F denota el número de moléculas de agua por ceramida. Por ejemplo, un sistema de matriz lipídica identificado con 33/33/33/75/5/1 denota un sistema con una concentración molar igual (33%) de ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres, donde el 75% del colesterol es ubicado en/asociado con las cadenas esfingoides de ceramida, donde la concentración molar total de O-acilceramida (por ejemplo, ceramida EOS), sin incluir el agua, es del 5 % y donde hay una molécula de agua por ceramida. 20 Un ejemplo de un sistema de matriz lipídica 33/33/33/75/5/1 se ilustra en las Figuras 8a-d y 9a-d, que muestran vistas superiores y laterales de ceramidas, colesterol, ácidos grasos libres y agua, respectivamente antes de las simulaciones MD.

25 Se usó ceramida EOS como O-acilceramidas, aunque se prevé que también se pueden usar otras O-acilceramidas como se ha descrito anteriormente en este documento.

30 Al usar el último cuadro de las simulaciones anteriores, se realizaron simulaciones de micrografías electrónicas (EM) (Rullgård et al., 2011). Al usar una secuencia de comandos Python, se generaron curvas de intensidad a partir de las imágenes EM donde se registró la intensidad de cada columna en la imagen. Se aplicó un filtro gaussiano con una desviación estándar de 1,0 para suavizar las curvas. Las imágenes EM simuladas se compararon luego con los datos EM experimentales obtenidos mediante el uso de criomicroscopía electrónica de secciones vítreas (CEMOVIS) en muestras de piel humana real. Tanto para las imágenes EM simuladas como para los datos de CEMOVIS se utilizó un nivel de desenfoque de -1,2 μm .

35 Las imágenes experimentales de CEMOVIS se distorsionaron ligeramente debido a las curvaturas de la estructura antes de calcular el perfil de intensidad y se utilizó la misma secuencia de comandos para alinear primero cada fila de píxeles para minimizar la diferencia entre su perfil de intensidad y el perfil de intensidad promedio de las filas previamente alineadas.

40 Se usó una secuencia de comandos de Python para dar un valor numérico de la diferencia entre dos curvas de intensidad de EM, para tener una medida de la similitud entre una imagen EM simulada y la imagen crio-EM experimental. Solo se utilizó la unidad periódica central de las imágenes crio-EM ya que su calidad de imagen era superior a la de los bordes de la imagen. La imagen fue recortada a mano, en base a una imagen crio-EM, que había sido enderezada (es decir, alineada, consulte la sección anterior). Las intensidades oscilaron entre 0 (negro en la imagen) y 255 (blanco en la imagen). Se utilizó un filtro gaussiano (desviación estándar 1,0) para suavizar ambas curvas antes de compararlas. Durante la comparación, se permitió que las curvas de intensidad rodaran (se movieran en la dimensión x), se escalaron las intensidades (en la dimensión y, con el valor de intensidad 127 como punto cero) y se cambiaron las intensidades (se movieron en la dimensión y) para reducir la diferencia entre las curvas tanto como sea posible. La diferencia medida fue la diferencia absoluta media en todos los puntos de las curvas de intensidad. Dado que los niveles de desenfoque más bajos producen imágenes con mayor resolución, los resultados se ponderaron por los factores 2, 1,5 y 1 para los niveles de desenfoque -1, -2 y -3 μm , respectivamente, y se presenta la suma de la diferencia absoluta promedio de las tres curvas en las tablas a continuación.

Resultados

55 Comparar los resultados de las simulaciones MD usando un modelo de la matriz lipídica del estrato córneo de acuerdo con la presente divulgación (donde A, B y C están dentro del rango reivindicado 30-35 %, D está dentro del rango reivindicado 80-70 %, E está dentro del rango reivindicado 1-8%, y F está dentro del rango reivindicado 0.2-2), así como para varios modelos no incluidos en las reivindicaciones (donde, por ejemplo, uno o más de A, B, C, D, E y F quedan fuera de los rangos anteriores), las curvas de intensidad para los diversos sistemas de matriz lipídica se compararon con una curva de intensidad correspondiente obtenida de CEMOVIS. Los resultados se muestran en las Figuras 2-7 y en las Tablas 7-12 que muestran las diversas composiciones del sistema y los espesores/periodicidades calculadas. El sistema de matriz lipídica del estrato córneo, después de la simulación MD, se muestra para 33/33/33/75/5/1 en las Figuras 10a-d, que ilustran vistas laterales de la organización de ceramidas, colesterol, ácidos grasos libres y agua, respectivamente.

Las Figuras 2a-g y la Tabla 7 muestran perfiles de intensidad, espesores/periodicidades y diferencias de comparación de

perfil de intensidad de EM automático para sistemas que tienen una concentración molar relativa igual (33%) de ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres, con el 75 % del colesterol ubicado en/asociado con las cadenas esfingoideas de ceramida, con una concentración molar total de EOS de ceramida del 5 %, y con un número variable de moléculas de agua por ceramida, es decir, 33/33/33/75/5/F con = 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Las simulaciones con 0, 3, 4 y 5 moléculas de agua por ceramida son ejemplos comparativos. En cuanto a las profundidades y alturas relativas de los valles y picos en los perfiles de intensidad, se puede observar que especialmente los sistemas con F=1 (Figura 2b) y con F=2 (Figura 2c) reproducen aproximadamente bien el perfil de los datos del CEMOVIS, aunque cada sistema tiene un espesor/periodicidad que se corresponde bien con los valores experimentales de 10,5-11 nm obtenidos de CEMOVIS (Iwai, 2012). Para obtener las diferencias de comparación automáticas del perfil de intensidad EM, las sumas de la diferencia absoluta promedio de la curva de intensidad EM se ponderaron por los factores 2, 1,5 y 1 en los niveles de desenfoque -1, -2 y -3 μm . Una diferencia de comparación baja significa una gran similitud entre la imagen EM simulada del sistema de matriz lipídica modelo y la imagen crio-EM experimental.

Tabla 7. Espesores/periodicidades calculadas para matrices lipídicas con números variables de moléculas de agua por ceramida.

Identificación (A/B/C/D/E/F)	Espesor/periodicidad (nm)	Diferencia de comparación automática del perfil de intensidad EM
33/33/33/75/5/0	10,5	29,3
33/33/33/75/5/1	10,6	28,3
33/33/33/75/5/2	10,5	31,2
33/33/33/75/5/3	10,8	37,2
33/33/33/75/5/4	10,8	38,5
33/33/33/75/5/5	10,8	39,8
33/33/33/75/5/6	10,8	40,9

Las Figuras 3a-h y la Tabla 8 muestran perfiles de intensidad, espesores/periodicidades y diferencias de comparación de perfil de intensidad EM automático para sistemas que tienen una concentración molar relativa igual (33%) de ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres, con una concentración molar total de EOS de ceramida del 5%, con una molécula de agua por ceramida, y con una cantidad variable de colesterol ubicado en/asociado con las cadenas esfingoide de ceramida, es decir, 33/33/33/D/5/1 donde D= 100, 90, 85, 80, 75, 70, 65 y 60 (donde D = 100, 90, 85, 65 y 60 son ejemplos comparativos). En cuanto al espesor/periodicidad, se puede observar en la Tabla 8 que se alcanza un espesor/periodicidad máxima para D=70, 75 u 80 y también que los perfiles de intensidad correspondientes (Figura 3f, e o d) reproducen aproximadamente el perfil de los datos de CEMOVIS bien.

Tabla 8. Espesores/periodicidades calculadas para matrices lipídicas con cantidades variables de colesterol ubicado en/asociado con cadenas esfingoides de ceramida.

Identificación (A/B/C/D/E/F)	Espesor/periodicidad (nm)	Diferencia de comparación automática del perfil de intensidad EM
33/33/33/100/5/1	9,2	44,2
33/33/33/90/5/1	9,7	41,5
33/33/33/85/5/1	9,9	35,8
33/33/33/80/5/1	10,3	31,2
33/33/33/75/5/1	10,5	28,3
33/33/33/70/5/1	10,5	28,8
33/33/33/65/5/1	10,2	29,2
33/33/33/60/5/1	10,0	33,2

Las Figuras 4a- y la Tabla 9 muestran perfiles de intensidad, espesores/periodicidades y diferencias de comparación de perfil de intensidad de EM automática para sistemas que tienen una concentración molar relativa igual de colesterol y ácidos grasos libres, con el 75 % del colesterol localizado en/asociado con las cadenas esfingoideas de ceramida, con una concentración molar total de EOS de ceramida del 5 %, con una molécula de agua por ceramida, y con una concentración molar relativa variable de ceramidas, es decir, A/B/C /75/5/1 donde A = 10, 20, 30, 33, 35, 40, 50 y 60 (en donde A = 10, 20, 40, 50 y 60 son ejemplos comparativos no incluidos en la invención reivindicada), y B = C = 50-0.5A. Con respecto al espesor/periodicidad, se puede observar en la Tabla 9 que el mayor espesor se logra para A= 30, 33, 35

(como se afirma), pero también que por ejemplo, A=25, A=40 y A=45 son relevantes a pesar de que estos valores se encuentran fuera del rango declarado. Lo mismo se aplica con respecto a las profundidades y alturas de los valles y picos de los perfiles de intensidad, es decir, en las Figuras 4c-f.

5 Tabla 9. Espesores/periodicidades calculadas para matrices lipídicas con concentraciones molares relativas variables de ceramidas

Identificación (A/B/C/D/E/F)	Espesor/periodicidad (nm)	Diferencia de comparación automática del perfil de intensidad EM
10/45/45/75/5/1	10,1	35,8
20/40/40/75/5/1	10,4	29,6
30/35/35/75/5/1	10,5	29,6
33/33/33/75/5/1	10,6	28,3
35/33/33/75/5/1	10,6	32,4
40/30/30/75/5/1	10,4	30,9
50/25/25/75/5/1	10,4	36,8
60/20/20/75/5/1	9,9	41,5

10 Las Figuras 5a- y la Tabla 10 muestran perfiles de intensidad, espesores/periodicidades y diferencias de comparación de perfil de intensidad de EM automática para sistemas que tienen una concentración molar relativa igual de ceramidas y colesterol, con el 75 % del colesterol localizado en/asociado con las cadenas esfingoides de ceramida, con una concentración molar total de EOS de ceramida del 5 %, con una molécula de agua por ceramida, y con una concentración molar relativa variable de ácidos grasos libres, es decir, A/B/C/75/5/1 donde C = 20, 30, 33, 35, 40 y 50 (donde C = 20, 40 y 50 son ejemplos comparativos abarcados por la invención reivindicada) y A = B = 50 -0.5C.

15 Tabla 10. Espesores/periodicidades calculadas para matrices lipídicas con concentraciones molares relativas variables de ácidos grasos libres.

Identificación (A/B/C/D/E/F)	Espesor/periodicidad (nm)	Diferencia de comparación automática del perfil de intensidad EM
40/40/20/75/5/1	9,3	48,9
35/35/30/75/5/1	10,1	33,5
33/33/33/75/5/1	10,6	28,3
33/33/35/75/5/1	10,6	33,0
30/30/40/75/5/1	10,6	35,4
25/25/50/75/5/1	9,7	38,0

20 Las Figuras 6a- y la Tabla 11 muestran perfiles de intensidad, espesores/periodicidades y diferencias de comparación de perfil de intensidad de EM automática para sistemas que tienen una concentración molar relativa igual de ceramidas y ácidos grasos libres, con el 75 % del colesterol localizado en/asociado con las cadenas esfingoides de ceramida, con una concentración molar total de EOS de ceramida del 5 %, con una molécula de agua por ceramida, y con una concentración molar relativa variable de colesterol, es decir, A/B/C/75/5/1 donde B = 10, 20, 30, 33, 35, 40, 50 (donde B = 10, 20, 40 y 50 son ejemplos comparativos no incluidos en la invención reivindicada) y A = C = 50-0,5B. En cuanto al espesor/periodicidad, se puede observar de la Tabla 11 que al menos B=20, 30, 33 y 35 (siendo B=30, 33 y 35 como se reivindica y B=20 como no abarcado por la invención reivindicada) corresponde al mayor espesor y que los perfiles de intensidad correspondientes (Figuras 6b-e) reproducen aproximadamente el perfil de intensidad de CEMOVIS bien.

25 Tabla 11. Espesores/periodicidades calculadas para matrices lipídicas con concentraciones molares relativas variables de colesterol.

Identificación (A/B/C/D/E/F)	Espesor/periodicidad (nm)	Diferencia de comparación automática del perfil de intensidad EM
45/10/45/75/5/1	10,1	42,9
40/20/40/75/5/1	10,7	37,0
35/30/35/75/5/1	10,8	35,3

33/33/33/75/5/1	10,6	28,3
33/35/33/75/5/1	10,4	29,4
30/40/30/75/5/1	9,8	33,7
25/50/25/75/5/1	8,8	43,2

Las Figuras 7a-g y la Tabla 12 muestran perfiles de intensidad, espesores/periodicidades y diferencias de comparación de perfil de intensidad de EM automático para sistemas que tienen una concentración molar relativa igual (33%) de ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres, con el 75 % del colesterol ubicado en/asociado con las cadenas esfingoides de ceramida, con una molécula de agua por ceramida, y con una concentración molar total variable de O-acil ceramida (aquí ceramida EOS), es decir, 33/33/33/75/E/1 donde E = 0, 3, 5, 8, 10, 13 y 15 (donde E = 0, 10, 13 y 15 son ejemplos comparativos no incluidos en la invención reivindicada). Puede observarse en la Tabla 12 y las Figuras 7b-e que especialmente E=3, 5, 8 (como se afirma) y 10 corresponde a un espesor/periodicidad comparable a los valores experimentales y que las curvas de intensidad correspondientes reproducen bien los datos de CEMOVIS aproximadamente.

Tabla 12. Espesores/periodicidades calculadas para matrices lipídicas con una concentración molar total variable de O-acilceramida (ceramida EOS).

Identificación (A/B/C/D/E/F)	Espesor/periodicidad (nm)	Diferencia de comparación automática del perfil de intensidad EM
33/33/33/75/0/1	10,0	34,3
33/33/33/75/3/1	10,4	29,5
33/33/33/75/5/1	10,6	28,3
33/33/33/75/8/1	10,7	35,2
33/33/33/75/10/1	11,1	39,0
33/33/33/75/13/1	11,2	38,6
33/33/33/75/15/1	11,2	41,0

Ejemplo II

Configuración del sistema y simulaciones

En este ejemplo, el sistema se configuró de acuerdo con el Ejemplo I, pero con un solo sistema de matriz lipídica correspondiente a 33/33/33/75/5/1.

Las permeabilidades de la matriz lipídica del estrato córneo al benceno, la codeína, el DMSO, el etanol, el naproxeno, la nicotina, la testosterona y el agua se calcularon mediante simulaciones directas e inversas de no equilibrio, basado en el teorema de fluctuación de Crooks y con el trabajo ponderado usando el Teorema de Disipación de Fluctuación de Dinámica Browniana (BD-FDT) (Chen, 2008).

A excepción del agua, para el cual se usaron los parámetros TIP3P, los parámetros CgenFF (Vanommeslaeghe et al., 2010) se generaron usando STaGE, usando Open Babel y MATCH para generar topologías GROMACS.

Las simulaciones se ejecutaron con Copernicus (Pronk et al., 2015) para configurar los sistemas y distribuir las simulaciones a varios trabajadores. Se insertaron dos moléculas en el sistema de membrana equilibrado en posiciones laterales aleatorias. La primera molécula se insertó en la interfaz entre el resto de cadena esfingóide de ceramidas, y la otra molécula se insertó entre el resto de ácido graso de ceramidas. Las moléculas se insertaron usando el comando gmx insert-molecules con escala = 0,275 e intentando insertarlo dentro de una distancia de 2,0 nm desde la posición seleccionada aleatoriamente en las dimensiones x e y y 0,1 nm en la dimensión z. Si no era posible encajar la molécula en 30,000 intentos, se elegía una nueva posición aleatoria. A partir de entonces, las moléculas se cultivaron en el sistema activando lentamente las interacciones con su entorno utilizando las opciones de desacoplamiento en GROMACS, comenzando en lambda = 0,75 y yendo linealmente a lambda = 0, donde lambda = 1 significa que no hay interacciones de Van der Waals o Coulomb con el resto del sistema.

Después de un equilibrio adicional (1 ns), las moléculas se empujaron hacia adelante y hacia atrás (coordenadas z crecientes y decrecientes) desde la misma posición inicial. Se usó una velocidad de tracción de 0,2 nm/ns para obligar a la molécula a moverse a través del sistema. El potencial marco fue de 15000 kJ/mol/nm² para agua, etanol, dmsol y benceno y de 40000 kJ/mol/nm² para codeína, naproxeno, nicotina y testosterona. Las simulaciones se realizaron utilizando un integrador dinámico estocástico de salto de rana a una temperatura de 303,15 K. La presión se mantuvo

utilizando un barostato semiisotrópico Parrinello-Rahman, ahora con compresibilidad 0 en la dirección z.

Cada simulación se realizó durante el tiempo suficiente para arrastrar ambas moléculas por completo a través del sistema y las simulaciones se repitieron, en posiciones iniciales aleatorias, para dar un tiempo de simulación total de 2-5 μ s (20-50 tirones en dirección hacia adelante y hacia atrás).

La coordenada de reacción se dividió en 200 bins para agrupar el trabajo realizado en todo el sistema. El punto cero del PMF, la energía libre de inserción, para el transporte a través de la membrana, se estableció calculando la diferencia de energía libre entre las moléculas solvatadas en agua, en una caja periódica en forma de dodecaedro con al menos 1,4 nm entre el soluto y el borde de la caja más cercano, en comparación con estar incrustado en la membrana en la interfaz entre las cadenas laterales del esfingoideo. Estos cálculos se realizaron utilizando el módulo de energía libre de Copernicus, que ejecuta simulaciones MD de GROMACS, en las que se desacoplan las interacciones entre una molécula y su entorno y se calcula la energía libre de desacoplamiento utilizando el método Bennett Acceptance Ratio (BAR) (Bennett, 1976). Copernicus optimiza automáticamente las distribuciones de puntos lambda para el desacoplamiento de la molécula (Pronk et al., 2015; Lundborg y Lindahl, 2014) y ejecuta las simulaciones de desacoplamiento en iteraciones (en pasos de 3 ns) hasta alcanzar el error estadístico deseado. Para garantizar la transferibilidad de los resultados de energía libre en agua en comparación con el estado ligado, todos los cálculos de energía libre se realizaron sin correcciones de dispersión de largo alcance (ya que las correcciones de dispersión de largo alcance no se recomiendan en CHARMM36 cuando se simulan bicapas lipídicas). Se realizaron tres cálculos para calcular la energía libre del estado solvatado, hasta que el error estadístico estimado no superó los 0,25 kJ/mol, y se realizaron seis cálculos para calcular la energía libre del estado ligado, lo que requirió un error estadístico de no más de 0,50 kJ/mol. Los promedios ponderados de Boltzmann de los resultados de los cálculos de la energía libre del estado solvatado y los resultados de los cálculos de la energía libre del estado ligado, respectivamente, se utilizaron para calcular la diferencia de energía entre los dos estados, que a su vez se usó como punto cero para el PMF en el siguiente paso.

El error del PMF se aproximó mediante el arranque estadístico del trabajo en cada contenedor, en $p = 0,32$ e incluyendo el error de la energía libre de enlace, mediante la propagación del error estándar. Los perfiles de resistividad se hicieron simétricos alrededor de $z = 0$ (centro de la membrana) para mejorar el muestreo. Al hacer los perfiles de resistividad simétricos, se permitió que el PMF se enrollara hasta 1/8 de la región para encontrar la diferencia mínima entre las dos mitades, para evitar grandes diferencias en caso de que el PMF no estuviera perfectamente centrado.

El trabajo disipativo, al igual que si se calculara la difusión a partir de los tiempos de autocorrelación integrados como se hace comúnmente en el muestreo marco, puede tener un perfil muy aproximado en el caso de un muestreo limitado. Por lo tanto, se suavizó aplicando una ventana de Hanning con una longitud de ventana de 11, con 200 puntos a lo largo de la curva.

Resultados

Las permeabilidades experimentales ($\log K_{P303K}$) y calculadas ($\log K_P$) en cm/h para benceno, codeína, DMSO, etanol, naproxeno, nicotina, testosterona y agua en cm/h se dan en la Tabla 13. Los valores de permeabilidad experimental mostrados se obtuvieron de células de difusión in vitro. Esto significa que se espera que estos coeficientes de permeabilidad hayan aumentado 10 veces (1 unidad logarítmica) a partir de la hidratación y potencialmente más a partir de, por ejemplo, daños por congelación, en comparación con el estado nativo. Las permeabilidades calculadas se presentan después de 2, 3, 4 y 5 μ s (20-50 tirones en cada dirección). Las permeabilidades experimentales se obtuvieron de la literatura a temperaturas que oscilan entre 25 y 37 °C. Para tener en cuenta la diferencia de temperatura, se aplicó una corrección (Abraham y Martins, 2004) para corregir los valores experimentales de acuerdo con:

$$\log K_{P303K} = \log K_{P_{exp}} + 0.04(303 - T_{exp}),$$

donde $\log K_{P303K}$ es el coeficiente de permeabilidad a 303 K, la temperatura a la que se realizaron las simulaciones MD, y donde $\log K_{P_{exp}}$ es el coeficiente de permeabilidad experimental a la temperatura T_{exp} a la que se realizó el experimento.

Tabla 13. Permeabilidades experimentales y calculadas para diferentes compuestos. Las incertidumbres presentadas corresponden a un error estándar

Compuesto:	$\log K_{P303K}$ (cm/h)	$\log K_P$ después de 2 μ s (cm/h)	$\log K_P$ después de 3 μ s (cm/h)	$\log K_P$ después de 4 μ s (cm/h)	$\log K_P$ después de 5 μ s (cm/h)
Benceno	-0,8	-2,1 $\pm$ 0,3	-1,7 $\pm$ 0,2	-1,4 $\pm$ 0,2	-1,0 $\pm$ 0,2
Codeína	-4,6	-6,8 $\pm$ 0,4	-6,4 $\pm$ 0,4	-5,9 $\pm$ 0,3	-6,4 $\pm$ 0,3
DMSO	-3,1	-4,1 $\pm$ 0,2	-4,8 $\pm$ 0,2	-4,5 $\pm$ 0,2	-4,2 $\pm$ 0,2
Etanol	-2,8	-2,3 $\pm$ 0,2	-2,7 $\pm$ 0,2	-2,9 $\pm$ 0,2	-2,7 $\pm$ 0,2
Naproxeno	-3,0	-3,2 $\pm$ 0,3	-3,9 $\pm$ 0,2	-4,0 $\pm$ 0,2	-4,1 $\pm$ 0,2

Nicotina	-1,8	-2,5±0,3	-2,3±0,3	-2,5±0,2	-2,1±0,2
Testosterona	-2,7	-6,3±0,4	-6,2±0,3	-5,8±0,3	-6,1±0,2
Agua	-2,9	-4,5±0,2	-4,5±0,2	-4,6±0,1	-4,7±0,1
Diferencia media		-1,27	-1,34	-1,24	-1,21
Diferencia media absoluta		1,40	1,39	1,24	1,24
Diferencia cuadrática media		3,00	2,85	2,26	2,60

Si se encontraron permeabilidades experimentales en múltiples fuentes, se calculó y usó la permeabilidad promedio. Los valores experimentales usados junto con las referencias se dan en la Tabla 14.

5 Tabla 14. Permeabilidades experimentales y experimentales ajustadas para diferentes compuestos.

Compuesto:	log K _{Pexp}	T _{exp} (°C)	Referencia
Benceno	-0,80	25	Mitragotri et al., 1995
	-0,95	31	Blank and McAuliffe, 1985
Codeína	-4,6	37	Roy and Flynn, 1989
DMSO	-3,1	n/a	Daugherty, 1997
Etanol	-3,00	25	Scheuplein, 1965
	-3,10	25	Scheuplein and Blank, 1973
Naproxeno	-2,54	37	Degim et al., 1998
	-3,40	25	Barratt, 1995
Nicotina	-2,48	37	Degim et al., 1998
	-1,71	25	Barratt, 1995
Testosterona	-2,70	25	Mitragorti et al., 1995
	-3,40	26	Scheuplein et al., 1969
Agua	-3,00	25	Scheuplein, 1965
	-3,30	25	Scheuplein and Blank, 1973

Puede observarse en la Tabla 13 que los valores de permeabilidad calculados, utilizando el método de cálculo de la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo a diferentes compuestos de acuerdo con la presente divulgación, son inferiores a los coeficientes de permeabilidad encontrados en la literatura. Esto es de esperar ya que los experimentos in vitro que utilizan células de difusión muestran una mayor permeabilidad debido a la hidratación excesiva del parche cutáneo (Idson, 1983 y van der Merwe y Ackermann, 1987). Como se muestra arriba en, por ejemplo, la Tabla 13 y la Tabla 14, los valores experimentales son aproximadamente -2,9 a 300 K y -2,8 a 310 K. Usando el método presentado en este documento, el log K_P calculado de permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo al agua es -4,9 a 300 K, -4,7 a 303 K y -4,5 a 310 K. Los valores de permeabilidad calculados utilizando el método descrito en este documento son similares a los calculados en un estudio (Das et al., 2009), que calculó el log K_P de permeabilidad (en cm/h) de la matriz lipídica del estrato córneo al agua a -4,9 a 300 K, mientras que un segundo estudio (Gupta et al., 2016) lo calculó en -0,59 a 310 K. Es importante destacar que volver a calcular el coeficiente de permeabilidad (log K_P) de las cifras publicadas de Das et al., 2009 da como resultado aproximadamente log K_P -1,4 cm/h indicando que el valor dado en Das et al. se debe a un error de cálculo. Ambos estudios emplearon sistemas modelo más simples, con respecto a la heterogeneidad de ceramidas y ácidos grasos, con ceramidas en configuración de horquilla y el sistema bicapa rodeado de agua. No se han realizado cálculos previos del coeficiente de permeabilidad en sistemas atómicos de sistema bicapa apilado con ceramidas en configuración extendida.

En el segundo estudio (Gupta et al, 2016), se calcularon las permeabilidades a 11 compuestos, incluidos algunos de los presentados aquí. Se encontró que la diferencia absoluta promedio entre los valores log K_P calculados y experimentales era 2,9 (correspondiente a una diferencia promedio de permeabilidad del factor 800), mientras que la diferencia cuadrática promedio en el log K_P se determinó que era 12,8. En Gupta et al., todos los permeantes, excepto la urea, tenían una permeabilidad calculada que era demasiado alta en comparación con las permeabilidades experimentales, lo que no es consistente con la observación de que los datos in vitro ya sobrestiman la permeabilidad.

Utilizando el método para calcular la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo a los compuestos presentados, por ejemplo, en la Tabla 13, se puede observar que la diferencia absoluta promedio entre los valores $\log K_P$ calculados y experimentales es 1,24 (una diferencia promedio de permeabilidad del factor 17) y que la diferencia cuadrática promedio en $\log K_P$ es 2,60

Ejemplo III

Configuración del sistema y simulaciones

En este ejemplo, el sistema se configuró de acuerdo con el Ejemplo I, pero con un solo sistema de matriz lipídica correspondiente a 33/33/33/75/5/1. Además, se insertaron en el sistema diferentes ejemplos de agentes potenciadores de la permeabilidad (PMA), tales como azona, DMSO, ácido oleico, ácido esteárico y agua. Los PMA se insertaron uno por uno y se realizaron simulaciones para un PMA insertado a la vez a una concentración del 9% en peso.

A partir de la salida de producción de las simulaciones MD como en el Ejemplo I, se insertó un PMA en el sistema a diferentes concentraciones usando el comando `gmx insert-molecules` en GROMACS con 1000 intentos antes de rendirse y escalar los radios de Van der Waals de las moléculas en 0,40.

Si no se podía insertar el número solicitado de moléculas, el factor de escala se reducía en pasos de 0,05 hasta que se podía insertar el número solicitado de moléculas. La opción `-allpairs` también se usó para evitar pérdidas de memoria.

Después de completar la inserción de un PMA, el sistema con el PMA se minimizó con respecto a la energía, se equilibró y se corrieron las etapas de producción. Las etapas de producción fueron las mismas que en el ejemplo anterior, pero con la excepción de que la última etapa de equilibrio, sin restricciones, se dividió en tres partes: 50 ns a 303,15 K, 150 ns a 318,15 K y 50 ns a 303,15 K. El motivo de este aumento de temperatura fue acelerar el equilibrio del sistema. Los cálculos de permeabilidad y PMF se realizaron como se describió anteriormente.

Resultados

El efecto de algunos PMA en las dimensiones del sistema de matriz lipídica del estrato córneo se muestra en la Tabla 15. Se especifica el efecto sobre el espesor del sistema (periodicidad), el área superficial del sistema y la difusión lateral del átomo C1 del grupo principal de ceramida de la cadena lateral del esfinguido. Para el agua, el número de moléculas de agua añadidas (y su concentración en el sistema) se suma a las moléculas de agua ya presentes en la región del grupo principal. La organización de algunos PMA dentro de la estructura/sistema de matriz lipídica se puede ver en las Figuras 11 a-e, que muestran vistas laterales de la organización de azona, DMSO, ácido oleico, ácido esteárico y agua, respectivamente.

Tabla 15. Efecto calculado de algunos PMA (concentración 9% en peso) en las dimensiones del sistema de matriz lipídica del estrato córneo

PMA	Número por ceramida	Periodicidad (nm)	Área del sistema (nm ²)	D _{C1s} (1e-5 cm ² /s)
Ninguno		10,6	21,9	6,3e-5+7,5e-5
Azona	0,5	10,7	23,8	1,1e-4+3,6e-5
DMSO	2	10,9	23,2	2,8e-5+5,0e-5
Ácido oleico	0,5	10,6	24,2	3,9e-5+1,9e-4
Agua	8	11,7	21,8	7,5e-4+9,4e-5

Por ejemplo, los grupos polares de azona y ácido oleico se asociaron principalmente con la región del grupo principal de ceramida, y con colas no polares generalmente alineadas con las cadenas de ceramida y favoreciendo la región de ácidos grasos más larga. Se puede ver que el DMSO forma poros a través de la matriz lipídica, lo que puede ayudar a explicar sus propiedades de mejora de la penetración. Esto es, en esencia, lo mismo que si los lípidos hubieran sido extraídos de la matriz lipídica y reemplazados por DMSO. Se puede ver que las moléculas de agua se asocian con la región del grupo principal y también en las interfaces entre las cadenas lipídicas no polares. Esto puede mejorar la solubilidad general de las moléculas hidrófilas en la matriz lipídica y puede mejorar la penetración. Por lo tanto, un método de acuerdo con la presente descripción puede permitir ventajosamente predicciones detalladas, tal como si dicho PMA forma poros en la matriz lipídica, forma vesículas o distorsiona el empaquetamiento de la cadena lipídica en general.

El efecto de algunos PMA sobre la permeabilidad del sistema de matriz lipídica del estrato córneo a algunos compuestos se muestra en la Tabla 16. De la tabla se puede inferir que tanto la azona como el agua mejoran la permeabilidad del sistema a la totalidad de la codeína, la nicotina, la testosterona y el agua. En la Tabla 16 se puede ver que la adición de un 9 % en peso de agua como potenciador de la permeación a un sistema de matriz lipídica correspondiente a 33/33/33/75/5/1 aumenta la permeabilidad a un valor superior a la permeabilidad de experimentos con células de difusión

in vitro. Esto indica que el aumento de la hidratación en la membrana lipídica de la célula de difusión no es tan alto como el 9% en peso.

Tabla 16. Permeabilidades calculadas para diferentes compuestos (columnas) y PMA (filas). Las incertidumbres presentadas corresponden a un error estándar.

PMA	Codeína log K_P (cm/h)	Nicotina log K_P (cm/h)	Testosterona log K_P (cm/h)	Agua log K_P (cm/h)
Azona 9 % en peso	-2,8 $\pm$ 0,4	-1,2 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,3	-2,4 $\pm$ 0,2
Ácido oleico 9 % en peso	-1,4 $\pm$ 0,4	-0,2 $\pm$ 0,3	-1,1 $\pm$ 0,3	-2,9 $\pm$ 0,2
Ácido esteárico 9 % en peso	-5,1 $\pm$ 0,3	-1,1 $\pm$ 0,3	-4,0 $\pm$ 0,4	-3,7 $\pm$ 0,2
Agua 5 % en peso	-3,7 $\pm$ 0,2	-0,6 $\pm$ 0,1	-4,5 $\pm$ 0,2	-3,8 $\pm$ 0,1
Agua 9 % en peso	-2,7 $\pm$ 0,3	-0,2 $\pm$ 0,2	-1,5 $\pm$ 0,3	-2,2 $\pm$ 0,1
Ninguno	-6,3 $\pm$ 0,4	-2,3 $\pm$ 0,3	-6,2 $\pm$ 0,3	-4,5 $\pm$ 0,1
Experimental	-4,6	-1,8	-2,7	-2,9

Ejemplo IV

Configuración del sistema y simulaciones

Modelos atomísticos de modelos previamente publicados (Swartzendruber et al., 1989; Bouwstra et al., 2001; Hill and Wertz, 2003; McIntosh, 2003; Schröter et al., 2009; Iwai et al., 2012; y Mojumdar et al., 2016) se crearon construyendo un bloque de construcción representativo (2 bloques de construcción para el sistema propuesto por Mojumdar et al., 2016) de moléculas dispuestas como se propone en las publicaciones originales. Los bloques de construcción se repitieron para hacer una caja periódica de aproximadamente 10 x 10 x 2 moléculas. Al repetir los bloques de construcción, se cambiaron y reflejaron para garantizar que las estructuras iniciales generadas fueran simétricas, pero desordenadas.

Para cada sistema, se realizaron corridas de equilibrio y producción de simulación MD como se describe en el Ejemplo I.

Los cálculos de la permeabilidad al agua se realizaron de acuerdo con el Ejemplo II. Los coeficientes de permeabilidad presentados son de un tiempo total de simulación de 3 μ s (30 tirones en cada dirección).

Resultados

Los coeficientes de permeabilidad calculados se presentan en la Tabla 17. Los coeficientes de permeabilidad calculados usando modelos propuestos previamente, excepto por usar el modelo propuesto por Iwai et al., 2012, son significativamente más altos que el valor experimental (log K_P aproximadamente -2.9 cm/h). El modelo Iwai consta únicamente de ceramida NP C24 extendida, ácido graso libre C24 y colesterol, con todo el colesterol asociado con la fracción esfingolípido de ceramida. Se espera que los coeficientes de permeabilidad calculados a partir de un modelo realista sean inferiores a los obtenidos a partir de experimentos in vitro utilizando células de difusión, debido a los altos niveles de hidratación (Idson, 1983 y van der Merwe y Ackermann, 1987). Los coeficientes de permeabilidad obtenidos de acuerdo con la presente divulgación son ciertamente más bajos que los coeficientes obtenidos experimentalmente.

Tabla 17. Coeficientes de permeabilidad al agua calculados de modelos previamente propuestos como se encuentran en la técnica. Las incertidumbres presentadas corresponden a un error estándar.

Referencia	log K_{Pcalc} (cm/h)
Swartzendruber et al., 1989	-0.7 $\pm$ 0.2
Bouwstra et al., 2001	3.0 $\pm$ 0.2
Hill and Wertz, 2003	0.7 $\pm$ 0.3
McIntosh, 2003	-0.3 $\pm$ 0.2
Schröter et al., 2009	-0.5 $\pm$ 0.3
Iwai et al., 2012	-3.8 $\pm$ 0.2
Mojumdar et al., 2016	-1.0 $\pm$ 0.2

Ejemplo V

Configuración del sistema y simuladores

Se generaron modelos atomísticos de sistemas de matriz lipídica de la composición descrita en esta divulgación, así como una serie de ejemplos de sistemas comparativos para comparación, tal como en el Ejemplo I. En general, los sistemas se describen de acuerdo con la notación A/B/C/D /E/F; donde A, B y C indican la concentración molar relativa, sin incluir el agua, de ceramidas (incluidas las ceramidas no O-aciladas y las O-aciladas), colesterol y ácidos grasos libres, respectivamente; donde D indica la cantidad relativa de colesterol localizado en/asociado con las cadenas esfingoides de ceramida; donde E indica la concentración molar total de O-acilceramida (por ejemplo, ceramida EOS), sin incluir el agua; y donde F denota el número de moléculas de agua por ceramida.

Sin embargo, hay algunas excepciones especiales. Los sistemas 33-horquilla/33/33 bicapa apilada (sin agua) y 33-horquilla/33/33 bicapa (con agua) solo consistían en ceramida NP C24, ácido graso libre C24 y colesterol. Las ceramidas estaban todas dispuestas en la configuración de horquilla. Una se ordenó como una bicapa apilada sin agua, mientras que la otra tenía aproximadamente 5 nm de agua entre las bicapas lipídicas. El sistema con agua es similar al que se suele utilizar cuando se calcula la permeabilidad al agua a través de la matriz lipídica mediante simulaciones MD (Das et al., 2009; Gupta et al., 2016). En los sistemas 33-np/33/33/75/5/1 y 33-ns/33/33/75/5/1, las no acilceramidas eran solo ceramida NP o ceramida NS. En el sistema 33-C20-50/33/33/75/5/1, el 50 % de la ceramida tiene una cadena esfingoides de longitud 18C y el 50 % tiene una cadena esfingoides de longitud 20C. En los otros sistemas solo se usó una longitud de cadena esfingoides de 20C. El sistema 33/33-CHOL-SULF-10/33/80/5/1 tenía 10 % del colesterol reemplazado por sulfato de colesterol y el sistema 33/33/33-cargado-FFA-10/80/5/1 tenía 10 % de los ácidos grasos libres sustituidos por ácidos grasos libres cargados (desprotonados). El sistema 33/33/33- noXFFA30/75/5/1 tenía 2,3 % (de ácidos grasos libres) de ácidos grasos libres de longitud de cadena C30, en comparación con 15,9 % en el sistema 33/33/33/75/5/1. El 33/33/33/100/0/0 es similar al propuesto por Iwai et al., 2012, pero con la distribución de longitud de cadena de ceramida y ácidos grasos libres, así como la mezcla de ceramida NS/NP, como se describe en el compendio de ejemplos anterior.

Para cada sistema, se realizaron corridas de equilibrio y producción de simulación MD como se describe en el Ejemplo I.

Los cálculos de la permeabilidad al agua se realizaron de acuerdo con el Ejemplo II. Los coeficientes de permeabilidad presentados son de un tiempo total de simulación de 3 ms (30 tirones en cada dirección).

Resultados

Los resultados de los cálculos de permeabilidad se presentan en la Tabla 18. Se puede observar que los modelos de horquilla no reproducen los datos experimentales, mientras que, por ejemplo, 33/33/33/75/5/1 dan como resultado un coeficiente de permeabilidad muy cercano a los datos experimentales. El uso de una mezcla de ceramida NS y NP en comparación con solo ceramida NS o NP no afecta significativamente los resultados. Ceramida EOS aumenta la permeabilidad del agua a través del sistema.

Tabla 18. Coeficientes de permeabilidad para el agua obtenidos mediante métodos de acuerdo con la presente descripción. Las incertidumbres presentadas corresponden a un error estándar. Los sistemas de acuerdo con la presente invención se indican con *. Los sistemas restantes son ejemplos comparativos.

Sistema	log K _{Pcalc} (cm/h)
33-horquilla/33/33 bicapa apilada (sin agua)	-3,1 ± 0,1
33-horquilla/33/33 bicapa (con agua)	-1,4 ± 0,1
33/33/33/100/0/0	-5,5 ± 0,1
33/33/33/100/5/1	-4,6 ± 0,2
33/33/33/75/0/1	-5,3 ± 0,2
33/33/33/75/5/0	-3,6 ± 0,3
33/33/33/75/5/1*	-4,5 ± 0,2
33/33/33/75/5/2*	-4,8 ± 0,1
33/33/33/75/5/4	-2,9 ± 0,2
33/33/33/75/5/6	-4,0 ± 0,1
33/33/33/75/10/1	-3,5 ± 0,2
33/33/33/70/5/1*	-3,8 ± 0,2
33/33/33/70/5/2*	-4,9 ± 0,2
33-np/33/33/75/5/1*	-4,2 ± 0,1

33-ns/33/33/75/5/1*	-4,3 ± 0,1
33-C20-50/33/33/75/5/1*	-4,5 ± 0,2
33/33/33/80/5/1*	-4,9 ± 0,2
33/33-CHOL-SULF-10/33/80/5/1-	-3,7 ± 0,1

Ejemplo VI

Configuración del sistema y simulaciones

Permeabilidades del modelo atomístico del sistema propuesto por Iwai et al. (Iwai et al., 2012) para benceno, codeína, dmsó, naproxeno, nicotina, testosterona y agua. Los resultados se compararon con las permeabilidades calculadas del sistema de matriz lipídica correspondiente a 33/33/33/75/5/1, de acuerdo con la presente divulgación, del Ejemplo II. Las permeabilidades de Iwai et al. sistema al agua se tomaron del Ejemplo IV.

Los cálculos de las permeabilidades se realizaron de acuerdo con el Ejemplo 2. Los coeficientes de permeabilidad presentados son de un tiempo de simulación total de 3 µs (30 tirones en cada dirección).

Resultados

La comparación entre la permeabilidad del sistema propuesta por Iwai et al. y el sistema 33/33/33/75/5/1, de acuerdo con la presente divulgación, se presenta en la Tabla 19. Se puede observar que la diferencia absoluta media es ligeramente mayor para el sistema Iwai y la diferencia cuadrática media es mayor. Lo que es más importante, el modelo de Iwai sobreestimó la permeabilidad de todos los compuestos excepto el agua. Así, el sistema propuesto por Iwai et al. predice una mayor permeabilidad que los resultados experimentales de las células de difusión, que ya se espera que sobrestimen la permeabilidad en comparación con la piel in vivo. Las sobreestimaciones son mayores para los compuestos no polares, es decir, con $\log P_{\text{octanol-agua}} > 0$, mientras que el agua, el DMSO y el etanol coinciden mejor con los datos experimentales. La mayoría de los fármacos adecuados para la administración a través de la piel son no polares. Por lo tanto, el método inventivo para predecir la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo que utiliza un modelo como el descrito en este documento supera al sistema Iwai en esta comparación.

Tabla 19. Permeabilidades calculadas, después de 3 ms de muestreo, de Iwai et al. sistema y el sistema 33/33/33/75/5/1, para diferentes compuestos. Las incertidumbres presentadas corresponden a un error estándar.

Compuesto:	$\log K_{p303K}$ (cm/h)	Iwai et al. $\log K_p$ (cm/h)	33/33/33/75/5/1 $\log K_p$ (cm/h)
Benceno	-0,8	0,6±0,1	-1,7±0,2
Codeína	-4,6	-1,5±0,2	-6,4±0,4
DMSO	-3,1	-2,9±0,3	-4,8±0,2
Etanol	-2,8	-2,5±0,3	-2,7±0,2
Naproxeno	-3,0	-0,8±0,1	-3,9±0,2
Nicotina	-1,8	0,6±0,1	-2,3±0,3
Testosterona	-2,7	-0,6±0,2	-6,2±0,3
Agua	-2,9	-3,8±0,2	-4,5±0,2
Diferencia media		1,49	-1,34
Diferencia media absoluta		1,70	1,39
Diferencia cuadrática media		4,25	2,85

Ejemplo VII

Los detalles de los productos de programas informáticos y los medios legibles por ordenador se dan en este ejemplo.

La Figura 12a es una ilustración esquemática y muy simplificada de un producto de programa informático inventivo 1 que comprende el código de programa informático 1a que, cuando se ejecuta mediante un dispositivo 2 que tiene capacidad de procesamiento, permite que el dispositivo 2 proporcione un modelo de la matriz lipídica del estrato córneo como se define en este documento.

La Figura 12b es una ilustración esquemática y muy simplificada de un medio 3 legible por ordenador, en la figura

ejemplificada por un disco versátil digital, que lleva el código de programa informático 1a como se define en este documento. La figura 12b muestra que el medio 3 legible por ordenador puede ser un medio de almacenamiento no volátil.

Lista de referencias

- 5
 - Abraham and Martins, 2004, J. Pharm. Sci. 93: 1508-1523.
 - Abraham et al., 2015, SoftwareX 1-2: 19-25.
 - Alder and Wainwright, 1959, J. Chem. Phys. 31: 459.
 - Barratt, 1995, Toxic. in vitro 9: 27-37.
- 10
 - Bennett, 1976, J. Comput. Phys. 22: 245-268.
 - Berendsen et al., 1984, J. Chem. Phys. 81: 3684-3690.
 - Blank and McAuliffe, 1985, J. Invest. Dermatol. 85: 522-526.
 - Bouwstra et al., 2001, Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 14: 52-62.
 - Bussi et al., 2007, J. Chem. Phys. 126: 014101.
- 15
 - Chen, 2008, J. Chem. Phys. 129: 144113.
 - Crooks, 1999, Phys. Rev. E, 60: 2721-2726.
 - Crooks, 2000, Phys. Rev. E, 61: 2361-2366.
 - Dahlén and Pascher, 1979, Chem. Phys. Lipids 24: 119-133.
 - Das et al., 2009, Soft Matter 5: 4549-4555.
- 20
 - Daugherty, 1997, Assessment of Chemical Exposures: Calculation Methods for Environmental Professionals (CRC Press), 309.
 - Degim et al., 1998, Int. J. Pharm. 170: 129-133.
 - Essmann et al., 1995, J. Chem. Phys. 103: 8577-8593.
 - Forney et al., 2008, Phys. Rev. E 78: 051913.
- 25
 - Gupta et al., 2016, J. Phys. Chem. B DOI: 10.1021/acs.jpcb.6b05451.
 - Hill and Wertz, 2003, Biochim. Biophys. Acta 1616: 121-126.
 - Hess et al., 1997, J. Comput. Chem. 18: 1463-1472.
 - Idson, 1983, Drug Metabol. Rev. 14: 207-222.
 - Iwai et al., 2012, J. Invest. Dermatol. 132: 2215-2225.
- 30
 - Jorgensen et al., 1983, J. Chem. Phys. 79: 926-935.
 - Klauda et al., 2010, J. Phys. Chem. B 114: 7830-7843.
 - Kosztin et al., 2006, J. Chem. Phys. 124: 064106.
 - Kumar et al. 1992, J. Comput. Chem. 13:1011-1021.
 - Lindahl et al., 2014, J. Chem. Phys. 141: 044110.
- 35
 - Lundborg and Lindahl, 2014, J. Phys. Chem. B 119: 810-823.
 - McIntosh, 2003, Biophys. J. 85: 1675-1681.
 - Mitragoti et al., 1995, J. Pharm. Sci. 84: 697-706.
 - Miyamoto et al., 1992, J. Comput. Chem. 13: 952-962.
 - Mojumdar et al., 2016, Biochim. Biophys. Acta 1858: 1926-1934.
- 40
 - O'Boyle et al., 2011, J. Cheminf 3: 33.
 - Park and Schulten, 2004, J. Chem. Phys. 120: 5946-5961.
 - Parrinello and Rahman, 1981, J. Appl. Phys. 52: 7182.
 - Pronk et al., 2013, Bioinformatics 29: 845-854.
 - Pronk et al., 2015, J. Chem. Theory Comput. 11: 2600-2608.
- 45
 - Roy and Flynn, 1989, Pharm. Res. 6: 825-832.
 - Rullgård et al., 2011, J. Microscopy 243: 234-256.
 - Scheuplein et al., 1965, J. Invest. Dermatol. 52: 63-70.
 - Scheuplein and Blank, 1973, J. Invest. Dermatol. 60: 286-296.
 - Scheuplein et al., 1969, J. Invest. Dermatol. 52: 63-70.
- 50
 - Schroter et al., 2009, Biophys. J. 97: 1104-1114.
 - Shirts and Chodera, 2008, J. Chem. Phys. 129: 124105-124110.
 - Swartzendruber et al., 1989, J. Invest. Dermatol. 92: 251-257.
 - Van der Merwe and Ackermann, 1987, Int. J. Cosmet. Sci. 9: 237-247.
 - Vanommeslaeghe et al., 2010, J. Comput. Chem. 31: 671-690.
- 55
 - Venable et al., 2014, Biophys. J. 107:134-145.
 - Yesselman et al., 2012, J. Comput. Chem. 33: 189-202.

REIVINDICACIONES

1. Un método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo a un compuesto, que comprende los pasos de:
- proporcionar un modelo de la matriz lipídica del estrato córneo que represente al menos una unidad repetitiva y que comprenda ceramidas, ácidos grasos libres, colesterol y agua, cuyo modelo comprende lo siguiente:
 - 30-35 % de ceramidas totales en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, de los cuales más del 90 % están en configuración extendida;
 - 30-35 % de ácidos grasos libres, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, en donde menos del 10 % de los ácidos grasos libres están cargados negativamente;
 - 30-35 % de colesterol, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, en donde 20-30 % de dicho colesterol está localizado por el resto de ácido graso de dichas ceramidas y 80-70 % de dicho colesterol está localizado por el resto esfingoide de las ceramidas y en donde menos del 10% de las moléculas de colesterol están reemplazadas por moléculas de sulfato de colesterol; y
 - 0,2-2 moléculas de agua por molécula de ceramida;

en donde dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo comprende aproximadamente 1-8 % de O-acilceramidas, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua;
 - proporcionar los designadores moleculares de un compuesto para el cual se va a predecir la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo, y
 - calcular, mediante simulación por ordenador, la permeabilidad predicha de la matriz lipídica del estrato córneo a dicho compuesto usando dicho modelo y los designadores moleculares del compuesto.
2. El método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el modelo en el paso a) comprende lo siguiente:
- 30-35 % de ceramidas totales en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, de los cuales más del 90 % están en configuración extendida y en donde 1-30 % de dichas ceramidas totales son O-acilceramidas y 99-70 % de dichas ceramidas totales son no O-acilceramidas; en donde el resto esfingoide de dichas no O-acilceramidas tiene una longitud de 18-20 carbonos y el resto de ácido graso de dichas no O-acilceramidas tiene una distribución de longitud de cadena de acuerdo con lo siguiente:
 - 0-15 % de las no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos o menos;
 - 0-15 % de las no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 21-22 carbonos;
 - 25-50 % de las no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 23-24 carbonos;
 - 20-50 % de las no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 25-26 carbonos;
 - 0-15 % de las no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 27-28 carbonos;
 - 0-20 % de las no O-acilceramidas tienen una longitud de cadena de ácido graso de 29 carbonos o más;
 - 30-35 % de ácidos grasos libres, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, en donde dichos ácidos grasos libres tienen una distribución de longitud de cadena de acuerdo con lo siguiente:
 - 0-15 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos o menos;
 - 0-15 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 21-22 carbonos;
 - 25-50 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 23-24 carbonos;
 - 20-50 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 25-26 carbonos;
 - 0-15 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 27-28 carbonos; y
 - 0-55 % de los ácidos grasos libres tienen una longitud de cadena de ácido graso de 29 carbonos o más

y donde menos del 10 % de los ácidos grasos libres están cargados negativamente;

iii) 30-35 % de colesterol, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, en donde 20-30 % de dicho colesterol está localizado por el resto de ácido graso de dichas ceramidas y 80-70 % de dicho colesterol está localizado por el resto esfingoide de las ceramidas y en donde menos del 10% de las moléculas de colesterol están reemplazadas por moléculas de sulfato de colesterol; y

iv) 0,2-2 moléculas de agua por molécula de ceramida.

3. El método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde 1-2 moléculas de agua por molécula de ceramida, tal como 1 molécula de agua por molécula de ceramida, están presentes en dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo.

4. El método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo comprende aproximadamente un 5 % de O-acilceramidas, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua.

5. El método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde aproximadamente el 1-30 % del total de ceramidas, tal como aproximadamente el 5-20 % del total de ceramidas, tal como aproximadamente el 13-17 % de las ceramidas totales son O-acilceramidas en dicho modelo de matriz lipídica del estrato córneo.

6. El método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde en dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo aproximadamente el 95-100 %, tal como aproximadamente el 98-100 %, tal como aproximadamente el 99-100 %, tal como aproximadamente el 100 % de las ceramidas totales están en configuración extendida.

7. El método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la concentración molar de ceramidas totales en dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo es de aproximadamente 30-35 % en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, tal como 33-34 % en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, y en donde 10-20 % de dichas ceramidas son O-acilceramidas, tal como 13-17 % de dichas ceramidas son O-acilceramidas.

8. El método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la relación de la concentración molar de ceramidas:ácidos grasos:colesterol en dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo es de aproximadamente 1:1:1 en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua.

9. El método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho modelo de la matriz lipídica del estrato córneo comprende lo siguiente:

i) 33-34 % de ceramidas totales en base a la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, de las cuales 95-100 % están en configuración extendida, y

en donde el 13 % de dichas ceramidas totales son ceramidas EOS y el 87 % de dichas ceramidas totales son no O-acilceramidas y en donde el resto esfingoide de dichas no O-acilceramidas tiene una longitud de 18 carbonos y el resto de ácido graso de dichas no O-acilceramidas tiene una distribución de longitud de cadena aproximadamente de acuerdo con la siguiente:

5.1 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos;

10,3 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 22 carbonos;

20,5 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 24 carbonos;

20,5 % de las no O-acilceramidas son ceramidas NS que tienen una cadena de ácidos grasos de 24 carbonos de longitud;

30,8% de las no O-acilceramidas son ceramidas NP que tienen una cadena de ácido graso de 26 carbonos de longitud;

10,3 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 28 carbonos; y

2,6 % de las no O-acilceramidas son NP de ceramida que tienen una longitud de cadena de ácido graso de 30 carbonos, y

ii) 33-34 % de ácido graso basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, en donde la distribución de la longitud de la cadena de ácido graso es aproximadamente de acuerdo con lo siguiente:

4,5 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 20 carbonos;

9,1 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 22 carbonos;

4,1 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 24 carbonos;

27,3 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 26 carbonos;

9,1 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 28 carbonos; y

15,9 % de los ácidos grasos tienen una longitud de cadena de ácido graso de 30 carbonos;

iii) 33-34 % de colesterol, basado en la concentración molar de todos los componentes excepto el agua, en donde aproximadamente el 25 % de dicho colesterol se localiza en el resto de ácido graso de ceramida de dichas ceramidas y aproximadamente el 75 % de dicho colesterol está localizado por el resto esfingoide de ceramida; y

iv) 1 molécula de agua por molécula de ceramida

10. El método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el método comprende además los pasos de:

d) proporcionar los designadores moleculares de un segundo compuesto para el cual se va a predecir la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo;

e) calcular, mediante simulación por ordenador, la permeabilidad predicha de la matriz lipídica del estrato córneo a dicho segundo compuesto usando dicho modelo y los designadores moleculares de dicho segundo compuesto; y

f) comparar la permeabilidad predicha obtenida con dicho primer compuesto calculado en el paso c) y con dicho segundo compuesto calculado en el paso d) y predecir el efecto de una diferencia estructural entre un primer compuesto y un segundo compuesto sobre la permeabilidad de la matriz lipídica del estrato córneo a dichos compuestos.

11. El método implementado por ordenador para predecir la permeabilidad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el paso a) comprende además los pasos de:

a1) proporcionar los designadores moleculares como se definen en este documento para al menos un agente modificador de la permeabilidad química (PMA);

a2) proporcionar, mediante simulación por ordenador utilizando el modelo de acuerdo con a) y los designadores moleculares del al menos un PMA de acuerdo con a1), un modelo modificado de la matriz lipídica del estrato córneo con el al menos un PMA;

en donde dicho modelo modificado de acuerdo con a2) se usa para predecir la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo con al menos un PMA al compuesto en el paso c).

12. El método implementado por ordenador para predecir el efecto de al menos un PMA en la organización de una matriz lipídica del estrato córneo, que comprende los pasos de:

a) proporcionar un modelo de la matriz lipídica del estrato córneo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9;

b) proporcionar designadores moleculares para dicho al menos un PMA; y

c) predecir, mediante simulación por ordenador utilizando el modelo del paso a) y los designadores moleculares del paso b), si dicho al menos un PMA interactúa principalmente con los grupos principales de las ceramidas, con los restos esfingoides o con los restos de ácido graso de las ceramidas de dicho modelo de matriz lipídica del estrato córneo.

13. Un uso de un modelo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para predecir la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo a un compuesto, uso del modelo para predecir la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo con al menos un agente modificador de la permeabilidad química (PMA) a un compuesto, uso del modelo para predecir el efecto de al menos un PMA sobre la permeabilidad de una matriz lipídica del estrato córneo a un compuesto, o uso del modelo para predecir el efecto de al menos un PMA sobre la organización de una matriz lipídica del estrato córneo.

14. Un producto de programa informático que comprende un código de programa informático que, cuando se ejecuta mediante un dispositivo que tiene capacidad de procesamiento, permite que dicho dispositivo proporcione un modelo de la matriz lipídica del estrato córneo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 5 15. Un medio legible por ordenador que lleva un código de programa informático de acuerdo con la reivindicación 14.

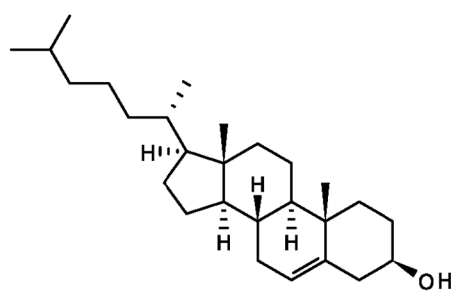


Fig. 1a

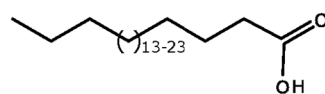


Fig. 1b

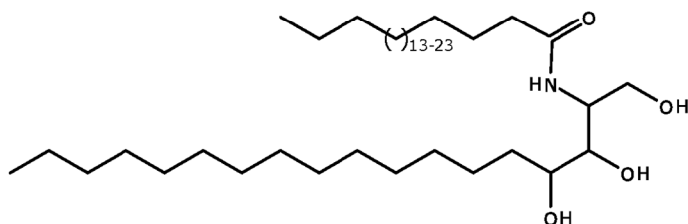


Fig. 1c

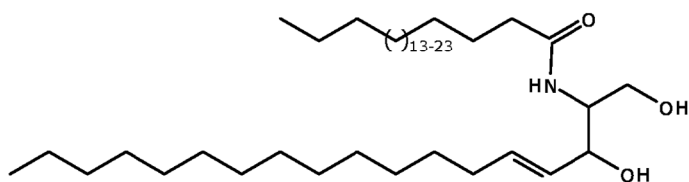


Fig. 1d

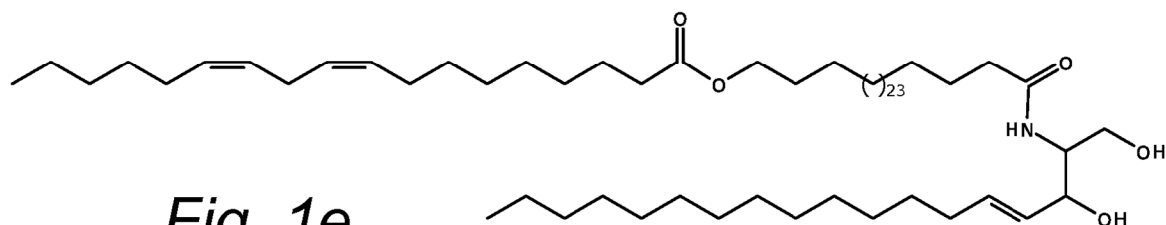


Fig. 1e

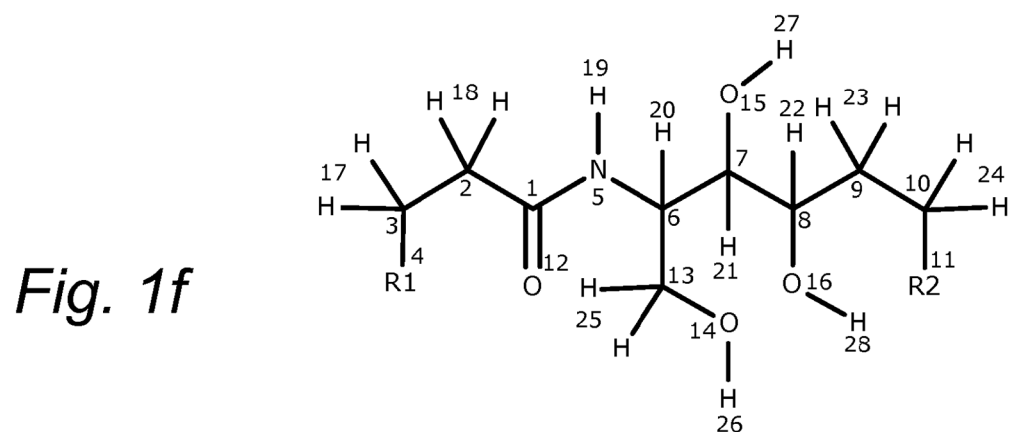
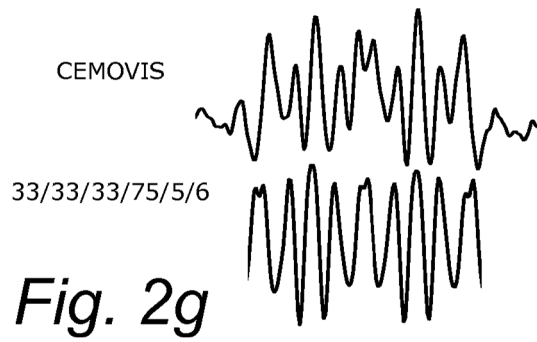
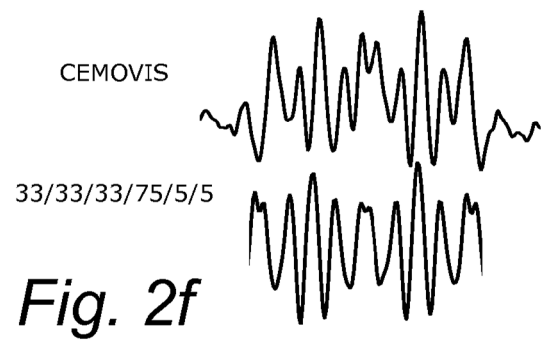
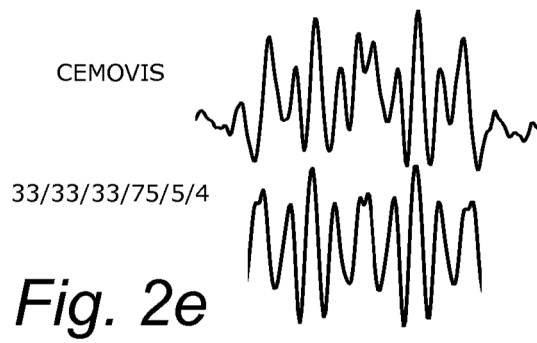
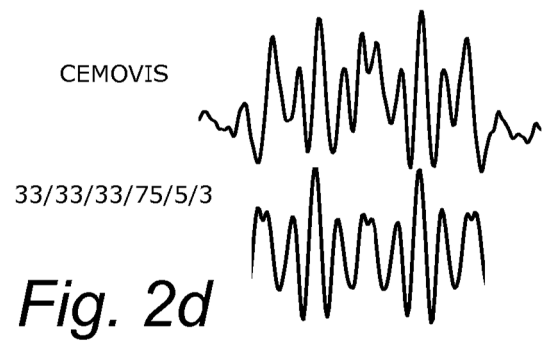
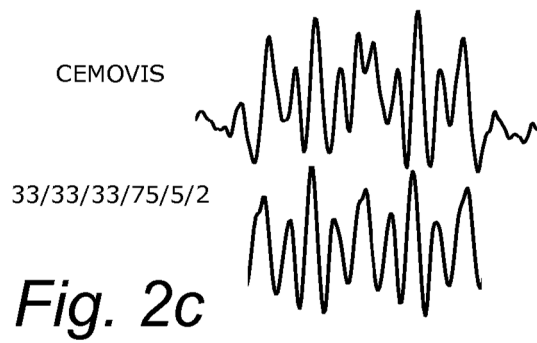
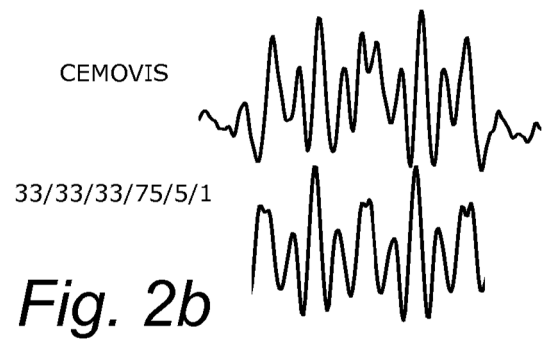
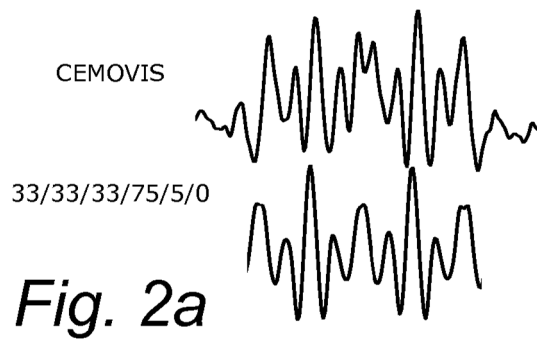
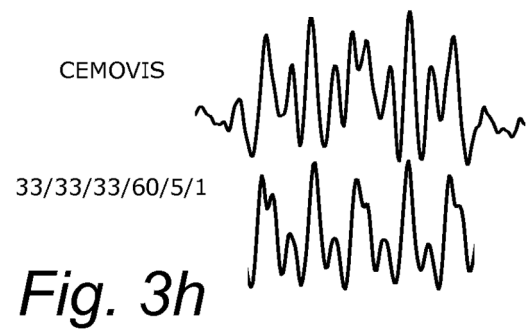
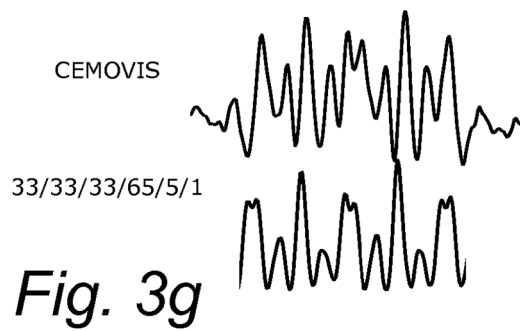
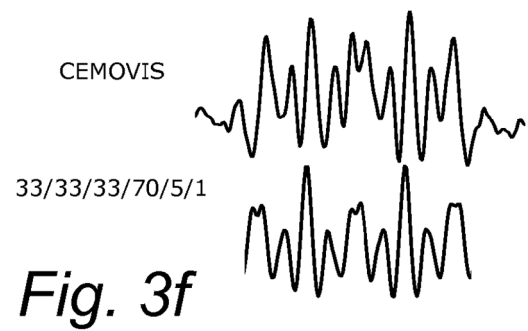
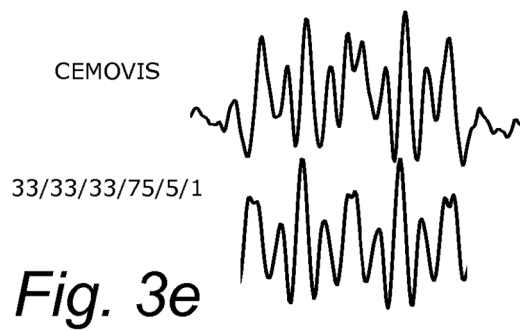
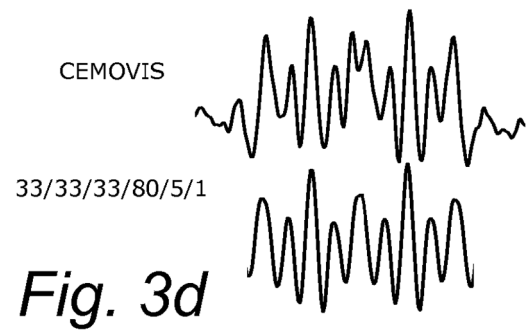
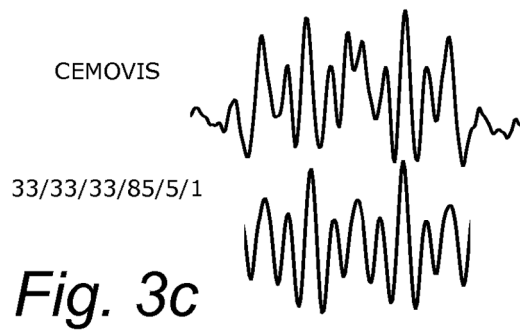
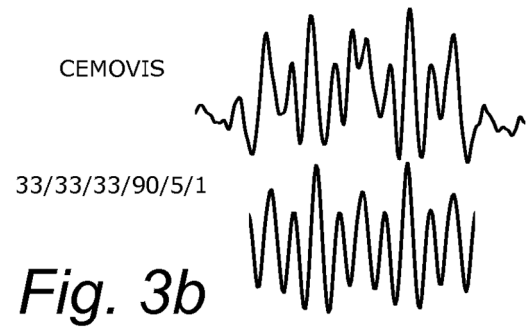
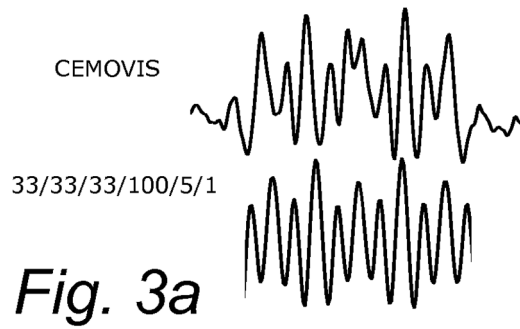


Fig. 1f





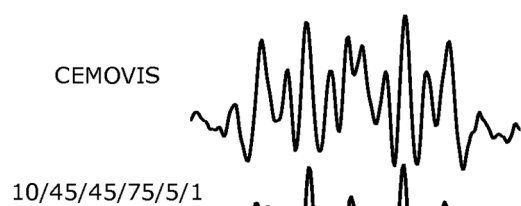


Fig. 4a

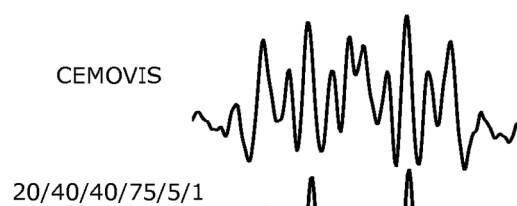


Fig. 4b

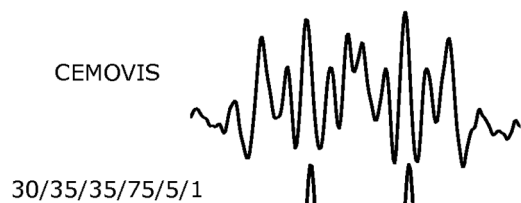


Fig. 4c

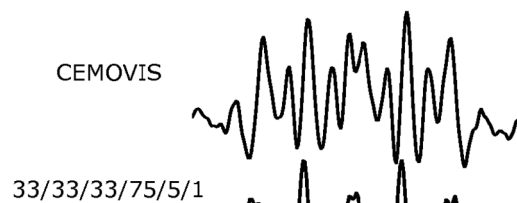


Fig. 4d

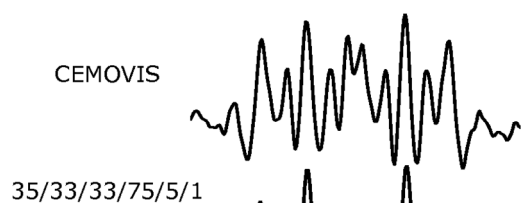


Fig. 4e

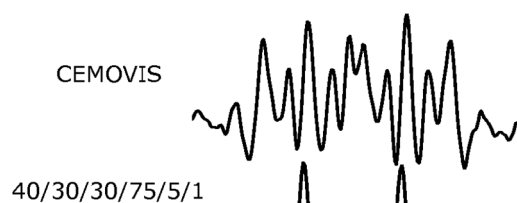


Fig. 4f

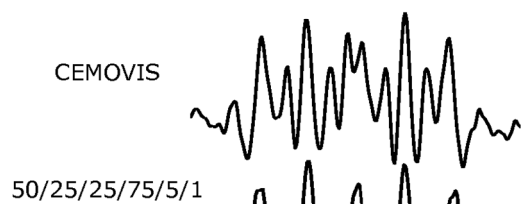


Fig. 4g

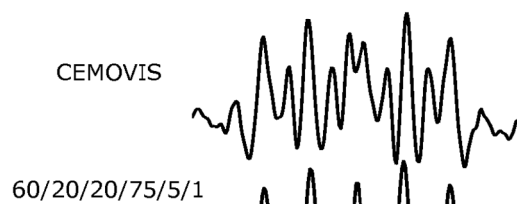
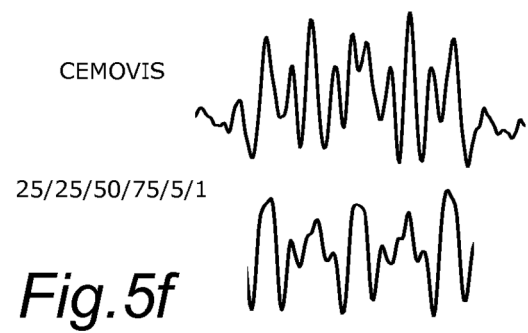
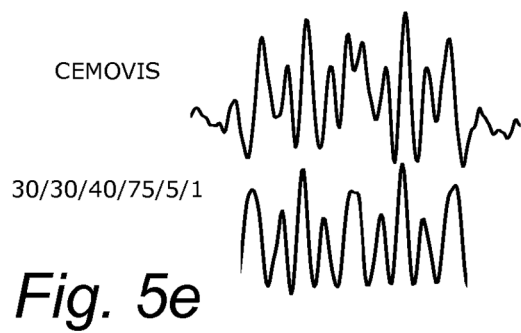
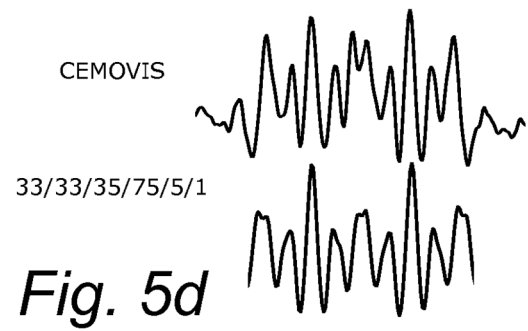
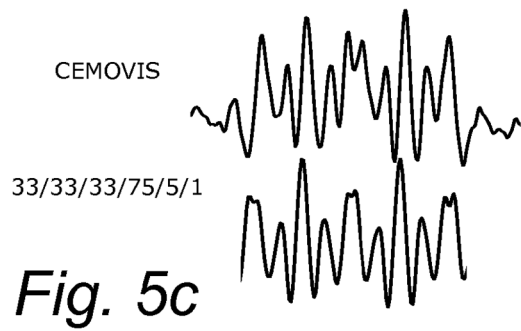
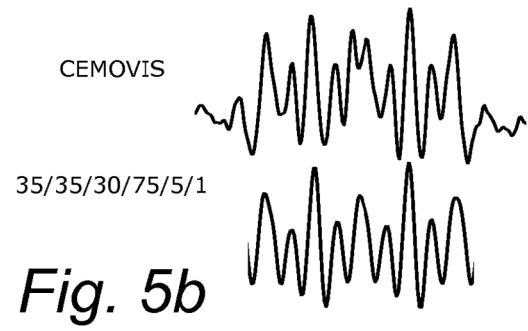
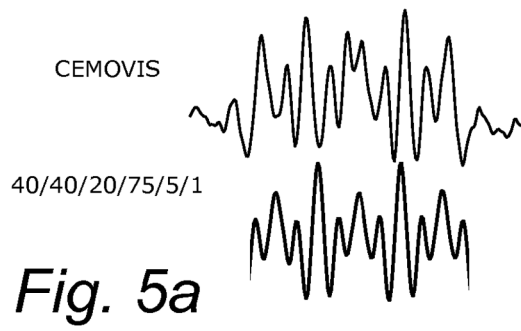
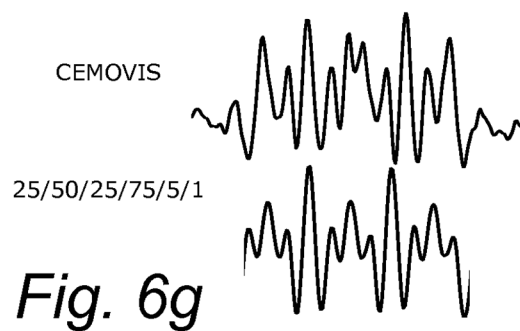
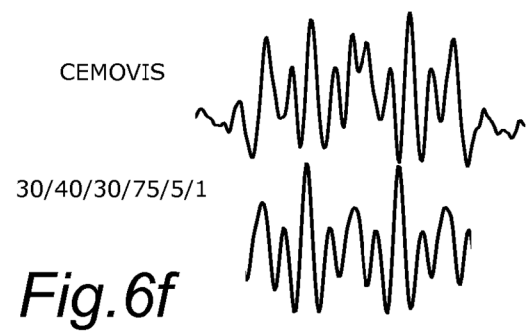
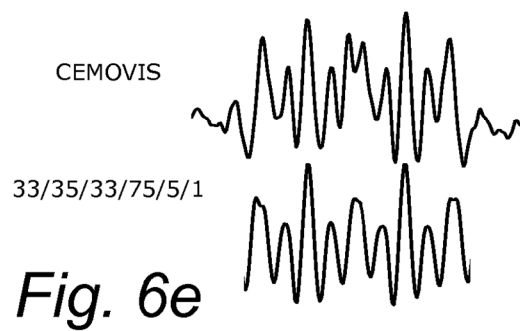
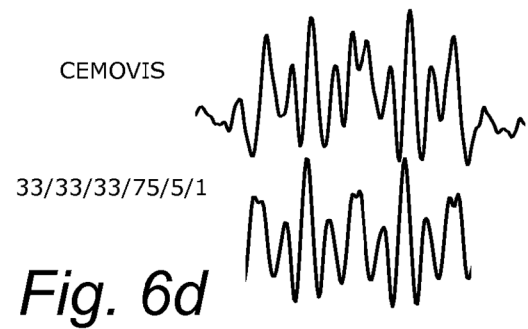
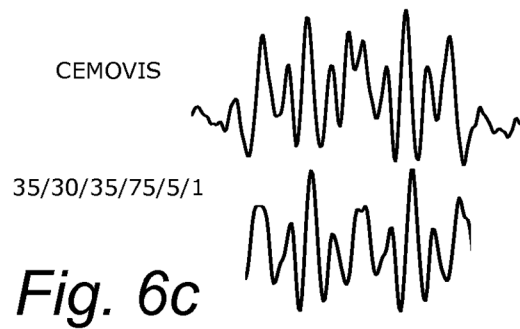
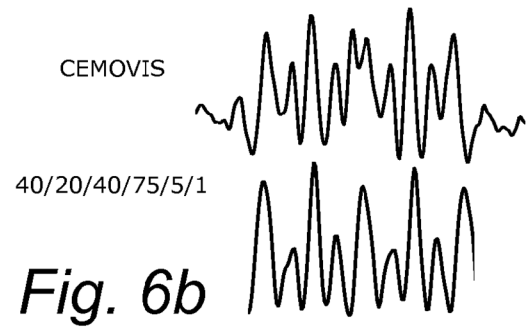
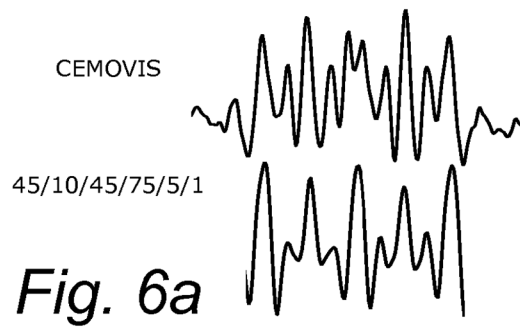
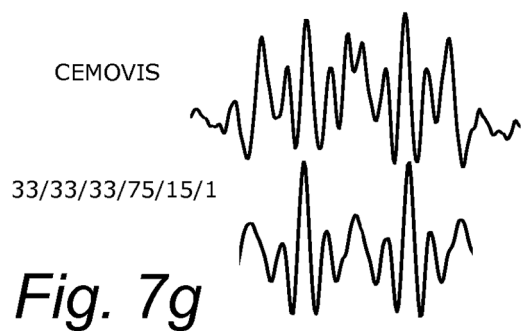
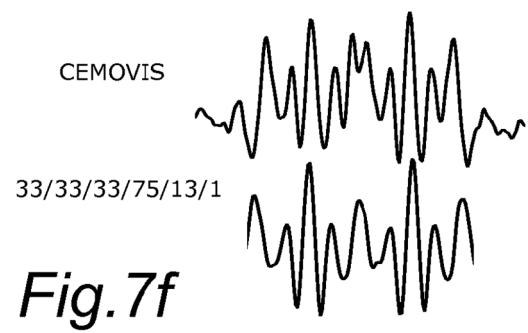
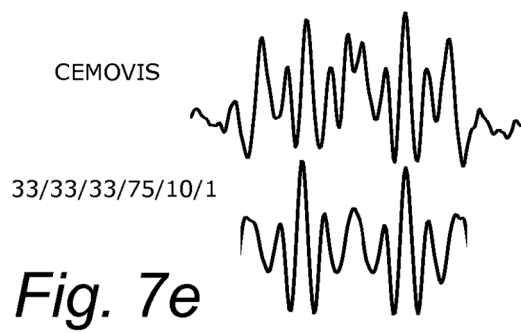
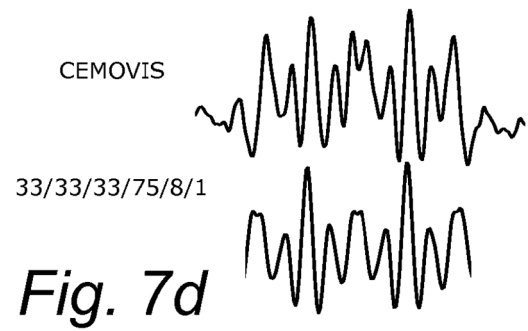
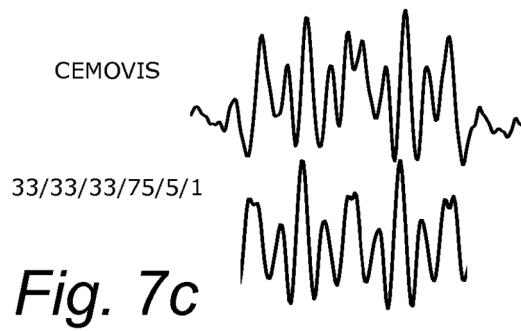
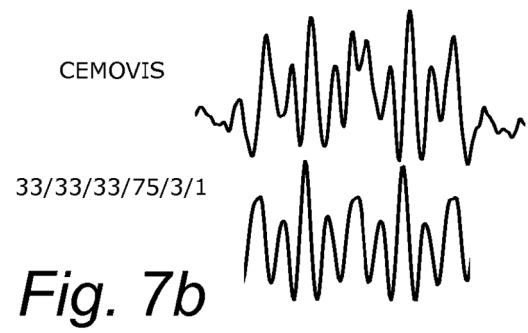
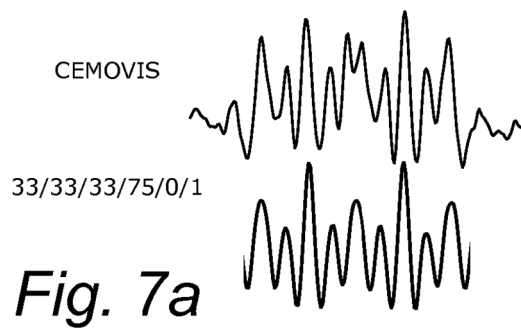


Fig. 4h







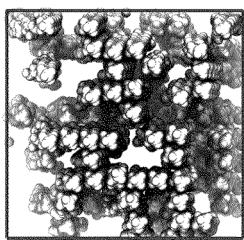


Fig. 8a

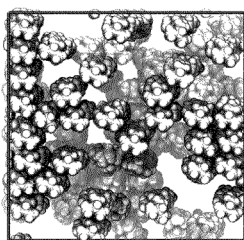


Fig. 8b

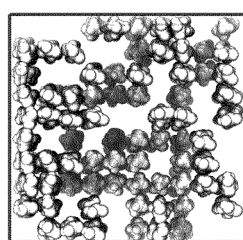


Fig. 8c

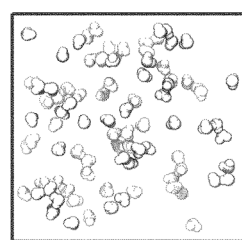


Fig. 8d

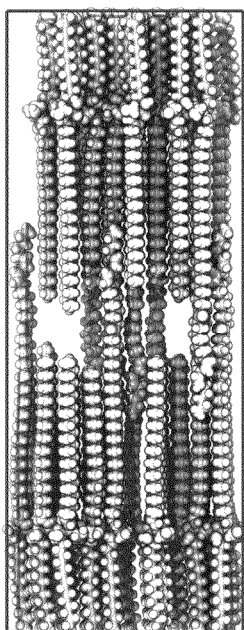


Fig. 9a

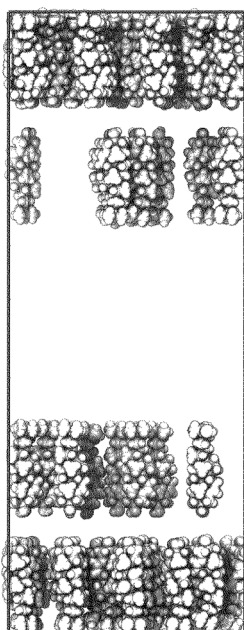


Fig. 9b

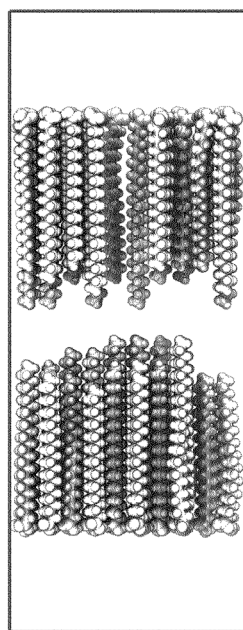


Fig. 9c

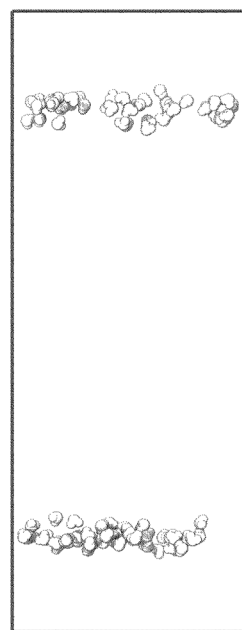


Fig. 9d

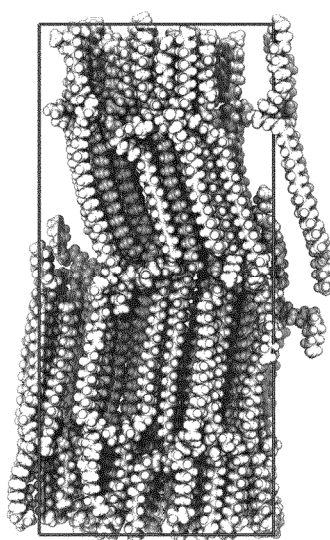


Fig. 10a

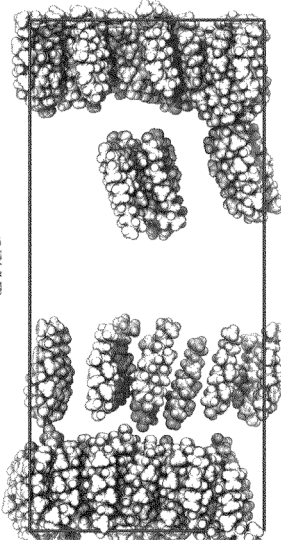


Fig. 10b

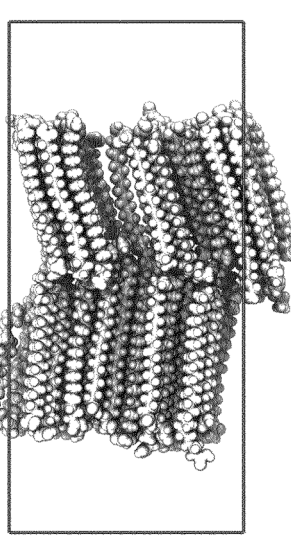


Fig. 10c

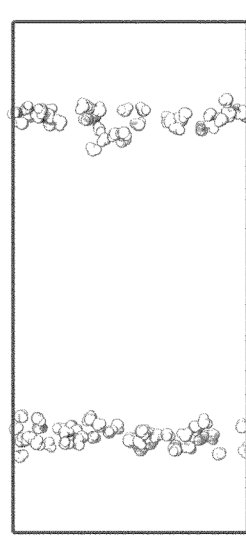


Fig. 10d

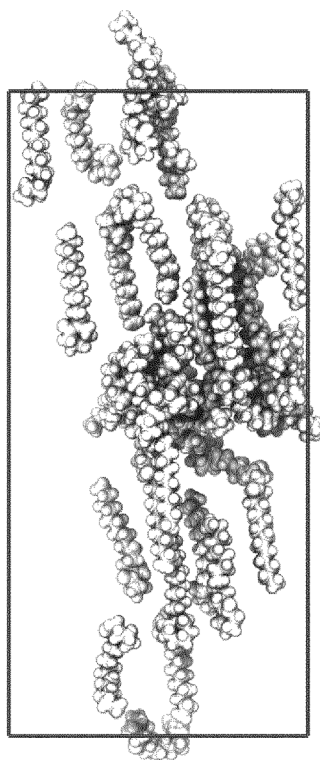


Fig. 11a

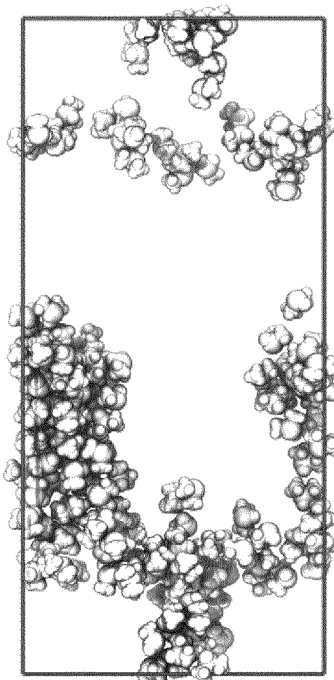


Fig. 11b

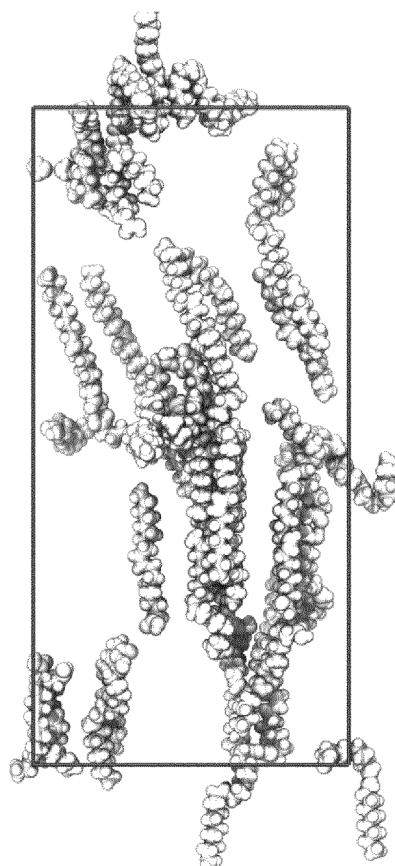


Fig. 11c

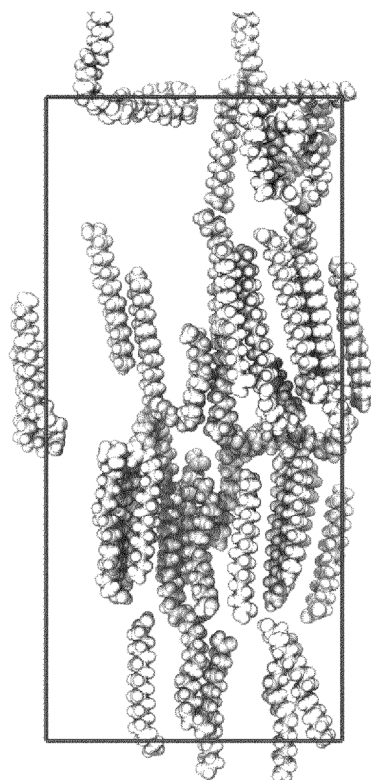


Fig. 11d

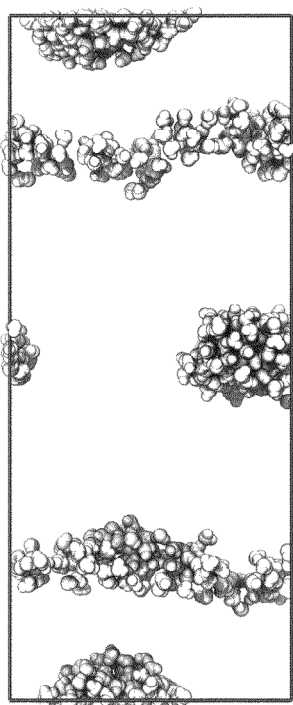


Fig. 11e

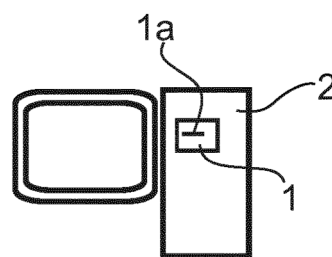


Fig. 12a

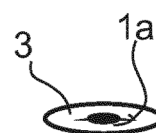


Fig. 12b