

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 730**

51 Int. Cl.:  
**A61Q 19/00** (2006.01)  
**A61K 8/98** (2006.01)  
**A61K 35/60** (2006.01)  
**A61Q 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07024856 .2**  
96 Fecha de presentación: **20.12.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1938866**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2008**

54 Título: **PRODUCTO COSMÉTICO QUE COMPRENDE UN COMPONENTE EXTRAIDO DE UNA MEMBRANA DE OVARIO DE PEZ SALMONIDAE.**

30 Prioridad:  
**22.12.2006 JP 2006346553**  
**22.12.2006 JP 2006346552**  
**06.09.2007 JP 2007231605**  
**06.09.2007 JP 2007231606**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.12.2011**

73 Titular/es:  
**NIPPON BARRIER FREE CO. LTD.**  
**41, KANDA-JINBO-CHO 1-CHOME**  
**CHIYODA-KU TOKYO 101-0051, JP**

72 Inventor/es:  
**Eto, Tadashi**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 369 730 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**

Producto cosmético que comprende un componente extraído de una membrana de ovario de pez Salmonidae

5 **Antecedentes de la invención**

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un producto para inhibir los síntomas de alergia de la piel; un producto cosmético para mejorar las afecciones de la piel para aclarar la pigmentación y las pecas, la reducción de la matidez de la piel y el blanqueo de la piel; un producto cosmético para mejorar los poros oscurecidos.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 Convencionalmente se conoce un procedimiento para extraer aminoácidos y péptidos del pez tratando previamente la membrana de ovario (saco de huevas) con agua con ozono y descomponiendo enzimáticamente las proteínas de las miofibrillas que constituyen la membrana ovárica (consúltese la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público nº 2004-73186).

20 Se ha dado a conocer que los aminoácidos y péptidos anteriores se pueden usar como sustancias fisiológicamente activas o preparaciones enriquecedoras de alimentos. Más específicamente, se ha dado a conocer que los aminoácidos y péptidos tienen actividades inhibitoras de la ECA y, por tanto, funcionan como agente inhibidor de un incremento de la presión arterial (agente antihipertensor).

25 Además, se ha dado a conocer que los componentes obtenidos tratando una membrana ovárica de pez de la familia de bacalao del pacífico, Gadidae o Clupeidae, con una proteasa, que es una enzima que descompone proteínas, se usan como preparaciones cosméticas (consúltese la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público 2006-225270).

30 Se sabe que los componentes obtenidos tratando la membrana ovárica de pez de la familia de bacalao del pacífico, Gadidae o Clupeidae, con una proteasa tienen una actividad de mantenimiento de un equilibrio entre las hormonas sexuales (actividad modificadora de la hormona sexual) activando e inhibiendo las hormonas sexuales. Las preparaciones cosméticas actuales inhiben la secreción de sebo mediante la actividad modificadora de la hormona sexual del componente y mejorar las espinillas, erupciones, piel áspera y arrugas.

35 Además, se sabe que un extracto obtenido tratando una membrana ovárica de salmón con una proteasa se usa como segundo derivado del agente de incremento del índice de envejecimiento fotopletismográfico, agente de incremento del valor de IGF-1 o agente de mejora de la piel áspera (consúltese las patentes japonesas nº 3946239, 3946238 y 3899116).

40 No obstante, no se conoce que los extractos obtenidos de una membrana ovárica de pez posean actividades distintas a la actividad de disminución de la presión arterial y la actividad modificadora de hormonas sexuales. Incluso si el extracto se limita al obtenido de una membrana ovárica de salmón, no se conocen actividades distintas del segundo derivado de la actividad de incremento del índice de envejecimiento fotopletismográfico, actividad de incremento del valor de IGF-1 y actividad de mejora de la piel áspera. En consecuencia, cabe esperar que los extractos obtenidos de la membrana ovárica de pez Salmonidae se desarrollen más para muchas aplicaciones.

50 El documento FR2096704 divulga un producto cosmético que comprende al menos una sustancia derivada de huevas de salmón y usada para regeneración/nutrición de la piel y para mantener el equilibrio de pigmentación de la piel.

55 El documento US2005/0271751 divulga composiciones cosméticas a base de extractos de hueva de pez Salmonidae para incrementar la concentración del factor de crecimiento en la dermis, de modo que se estimula la síntesis de colágeno y elastina en la piel.

El documento FR2767697 divulga composiciones dermatológicas que comprenden extractos de huevas de pez Salmonidae usados como agentes inmunomoduladores para inhibir la inflamación y los síntomas de alergia.

**Sumario de la invención**

60 De acuerdo con esto, es un objeto de la presente invención en las circunstancias anteriores proporcionar una nueva aplicación de una membrana ovárica de pez Salmonidae en sí misma o un componente extraído de la membrana ovárica.

65 Con el fin de alcanzar el objeto, un producto cosmético de acuerdo con la presente invención contiene una membrana ovárica de pez Salmonidae en sí misma o un componente obtenido tratando la membrana ovárica con

una proteasa.

Se conocen 11 géneros y 211 especies de peces que pertenecen a Salmonidae y ejemplos de los mismos incluyen Oncorhynchus keta, Oncorhynchus nerka, Oncorhynchus salmon, Oncorhynchus mykiss, Oncorhynchus masou y Oncorhynchus tshawytscha (salmón rey). La membrana ovárica de los peces Salmonidae anteriores es el saco de las huevas de los peces que pertenecen a Salmonidae y se pueden obtener recolectando las huevas de los ovarios y lavando los sacos únicamente con agua.

Además, se puede usar cualquier proteasa que puede descomponer proteínas que constituyan una membrana ovárica de salmón.

La de la presente invención se puede usar para inhibir los síntomas de alergia en la piel. El producto de acuerdo con la presente invención tiene una actividad de inhibición de la liberación de histamina y, de este modo, puede inhibir los síntomas de alergia, tal como enrojecimiento y prurito, causados por la histamina.

Un producto cosmético de la presente invención se puede usar para mejorar afecciones de la piel producidas por síntesis de melanina. El producto cosmético de acuerdo con la presente invención tiene una actividad para inhibir la síntesis de melanina y, de este modo, puede mejorar afecciones de la piel, por ejemplo aclarar la pigmentación y las pecas, la reducción de la matidez de la piel y el blanqueo de la piel, debido a la síntesis de melanina.

Un producto cosmético de la presente invención se puede usar para mejorar los poros oscurecidos. Los poros de, por ejemplo, las mejillas, la frente y la nariz de un cuerpo vivo, se pueden oscurecer. Se sabe que los poros se oscurecen mediante el depósito de una mezcla de sebo, queratina y similares, denominado tapón queratolítico en los poros; la adherencia de las manchas al tapón queratolítico y, después, la oxidación de las manchas o mediante pigmentación causada por la melanina de la piel alrededor de los poros. Un producto cosmético de acuerdo con la presente invención tiene una actividad para reducir el oscurecimiento de los poros y, por tanto, puede mejorar los poros oscurecidos.

Además, en el producto cosmético de acuerdo con la presente invención, el componente extraído de peces Salmonidae tratando la membrana ovárica con una proteasa es granos que tienen un tamaño medio de grano en el intervalo de 200 a 1400 nm. Los granos que tienen un tamaño medio de grano en el límite superior del intervalo pueden ser rápidamente absorbidos por la piel y pueden alcanzar una mayor eficacia cuando se usan como producto cosmético.

Los granos que tienen un tamaño medio de grano superior a 1400 nm pueden no ser absorbidos rápidamente por vía percutánea. Por el contrario, los granos finos que tienen un tamaño medio de grano inferior a 200 nm son difíciles.

#### Descripción breve de las figuras

La FIG.1 es un gráfico que muestra el número de poros oscurecidos visibles cuando el producto cosmético de la presente invención para mejorar poros oscurecidos se aplicó en toda la cara durante dos semanas;

La FIG. 2 es un gráfico que muestra el número de poros que mejoraron con respecto a los poros oscurecidos visibles de la FIG. 1;

#### Descripción de las realizaciones preferidas

A continuación, la realización preferida de la presente invención se describirá con detalle con referencia a las figuras adjuntas.

El producto cosmético de acuerdo con la realización contiene una membrana ovárica de pez Salmonidae en sí misma o un componente obtenido tratando la membrana ovárica con una proteasa.

Ejemplos de peces que pertenecen a Salmonidae incluyen Oncorhynchus keta, Oncorhynchus nerka, Oncorhynchus salmon, Oncorhynchus mykiss, Oncorhynchus masou y Oncorhynchus tshawytscha (salmón rey). La membrana ovárica de los peces Salmonidae es el saco de las huevas de los peces que pertenecen a Salmonidae y se pueden obtener recolectando las huevas de los ovarios y lavando los sacos únicamente con agua. En el producto cosmético de acuerdo con esta realización, la membrana ovárica lavada de los peces Salmonidae se pulveriza usando, por ejemplo, un mezclador, un mortero y una emulsionante, y la membrana ovárica pulverizada se puede usar directamente. Como alternativa se puede usar un componente obtenido tratando la membrana ovárica con una proteasa.

El componente obtenido tratando la membrana ovárica con una proteasa (en lo sucesivo, el componente se denomina componente de extracción de membrana ovárica) se puede preparar, por ejemplo, del siguiente modo:

En primer lugar, se prepara una membrana ovárica de pez Salmonidae como se ha indicado anteriormente y se usa

como materia prima. A la membrana ovárica se añade agua en una proporción en peso de membrana ovárica: Agua= 1:1 a 1:3. La mezcla se agitó para mezclar y se añade una proteasa en el intervalo de 1 a 3 % en peso a la cantidad total de la membrana ovárica. La mezcla resultante se calienta a 45 a 55 °C durante de 30 minutos a 5 horas, preferentemente durante 2 horas. Con este procedimiento, un componente descompuesto por la proteasa entre los componentes de la membrana ovárica se eluye en el agua para dar una solución acuosa del componente.

Después se inactiva la proteasa en la solución acuosa anterior. La inactivación se puede realizar mediante, por ejemplo, calentamiento de la solución acuosa a 90 °C durante 5 minutos.

Después, la solución acuosa simplemente se filtra a través de una tela metálica que tiene aproximadamente 30 mallas para eliminar las sustancias gruesas, tal como la membrana ovárica no descompuesta. El carbón activado se añade al filtrado obtenido para desodorizar, decolorar y desgrasar. La desodorización, decoloración y desgrasado del filtrado se puede realizar añadiendo carbón activado al filtrado en el intervalo de 2 a 4 % en peso de la cantidad total de la membrana ovárica como materia prima y calentando la mezcla resultante a 60 °C durante 30 minutos, por ejemplo.

Tras la desodorización, la decoloración y el desgrasado con el carbón activado, el filtrado se filtra usando, por ejemplo, una prensa con filtro. El filtrado obtenido se concentra a presión reducida a, por ejemplo, 60 °C y después se mantiene a, por ejemplo, 80 °C durante 10 minutos para esterilizar. El filtrado esterilizado se seca mediante secado por aerosol, para dar el componente de extracción de la membrana ovárica. El componente de extracción de la membrana ovárica contiene aminoácidos, péptidos, vitaminas, minerales, sacáridos, enzimas, ácidos nucleicos y metabolitos de los mismos, varios factores de crecimiento y citocinas.

El componente de extracción de la membrana ovárica puede además pulverizarse finamente de modo que tengan un tamaño medio de grano en el intervalo de 200 a 1400 nm. El componente de extracción de la membrana ovárica finamente pulverizado se puede obtener tratando el filtrado esterilizado con un emulsionante de presión ultra-alta a una presión en el intervalo de 980 a 2940 MPa.

El filtrado tratado con el emulsionante de presión ultra-alta se seca mediante secado por aerosol para dar un componente de extracción de la membrana ovárica que tenga un tamaño medio de grano en el intervalo mencionado anteriormente.

Aunque las razones no están lo suficientemente claras, el producto cosmético de la presente realización que contiene la propia membrana ovárica o el componente de extracción de la membrana ovárica tiene una actividad que se puede usar como uno cualquiera de los productos cosméticos siguientes:

- (1) un producto cosmético para inhibir los síntomas de alergia en la piel;
- (2) un producto cosmético para mejorar las afecciones de la piel para aclarar la pigmentación y las pecas, la reducción de la matidez de la piel y el blanqueo de la piel;
- (3) un producto cosmético para mejorar los poros oscurecidos.

El producto cosmético de la presente realización se puede preparar añadiendo, de acuerdo con las necesidades, aceite, un tensioactivo, una preparación vitamínica, un absorbente ultravioleta, un espesante, un humectante, un material auxiliar, un conservante y un colorante y similares, a la propia membrana ovárica de pez Salmonidae o al componente obtenido tratando la membrana ovárica con una proteasa de acuerdo con un procedimiento habitual. El producto cosmético puede estar en cualquier forma, tal como solución, crema, pasta, gel, gelatina, burbujas, un sólido, gránulos o polvo y similares, y se puede usar como tónico, crema, pomada, loción, emulsión, envase de tipo piel, lámina, aceite, jabón, limpiador, perfume, colonia y líquido para baño, un champú o un enjuague.

Además, el componente de extracción de la membrana ovárica se puede usar oralmente como agente para mejorar los poros oscurecidos.

A continuación se describirán ejemplos y ejemplos comparativos de la presente invención.

### **Ejemplo 1**

Se recolectaron las huevas de los ovarios de *Oncorhynchus keta* de Hokkaido, Japón, y la membrana ovárica se lavó suficientemente con agua. A 100 g de la membrana ovárica lavada se añadió agua purificada (100 ml) y la mezcla se pulverizó usando un mezclador (fabricado por Matsushita Electric Industrial Co., Ltd. con el nombre MXX1 07) durante un minuto. Este proceso de pulverización se repitió diez veces para dar una sustancia pulverizada. La sustancia pulverizada se trituró adicionalmente usando un mortero y después se filtró a través de una tela metálica de 300 mallas, y la sustancia resultante se usó como muestra.

La muestra preparada en este Ejemplo es una sustancia pulverizada de membrana ovárica de *Oncorhynchus keta*. Después, esta muestra preparada en este ejemplo se sometió a una prueba de inhibición de la liberación de histamina.

En la prueba de inhibición de la liberación de histamina, la muestra anterior se diluyó con agua purificada para preparar una solución muestra que contuviera 0,2 % de contenido de sólidos.

5 Después, a 1,2 ml de una suspensión de mastocitos aislados de la cavidad peritoneal de ratas (Slc: rata Wister macho de aproximadamente 4 a 9 semanas de edad) se añadieron 0,2 ml de la solución muestra y un agente de liberación de histamina (disponible en Sigma-Aldrich con el nombre de Compuesto 48/80), para preparar una solución de mezcla que contenía la muestra a una concentración de 1 µg/ml.

10 La solución de mezcla resultante se cultivó a 37 °C durante 15 minutos y la reacción se detuvo enfriando la solución con hielo. La solución de reacción se sometió a centrifugación. La histamina liberada se recogió del sobrenadante y se purificó. Después, la histamina liberada se hizo reaccionar con o-ftaldialdehído y la absorbancia de la fluorescencia se midió con una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm. La tasa de inhibición de la liberación de histamina se calculó de acuerdo con la ecuación siguiente:

15 
$$\text{Tasa de inhibición de liberación de histamina (\%)} = \{1 - (A - C) / (B - C)\} \times 100$$

En la ecuación, A representa la intensidad de a fluorescencia de la histamina liberada por los mastocitos en presencia de la muestra y el agente liberador de histamina; B representa la intensidad de la fluorescencia de la histamina liberada por los mastocitos en presencia del agente liberador de histamina; y C representa la intensidad de la fluorescencia de la histamina liberada de forma natural por los mastocitos. Cada uno de estos valores A, B y C se obtiene restando un valor de una prueba enmascarada del valor de la medición.

Los resultados se muestran en la tabla 1.

25 **Ejemplo 2**

A la muestra preparada en el Ejemplo 1 se añadieron 300 ml de agua purificada y la mezcla se pulverizó usando un emulsionante de presión alta (fabricado por Mizuho Industrial Co., Ltd, con el nombre de Microfluidizer M11 0E/ H) a una presión de tratamiento de 150 MPa. Este proceso de pulverización se repitió dos veces para dar una muestra.

La muestra preparada en este Ejemplo es una sustancia finamente pulverizada de membrana ovárica de *Oncorhynchus keta*. Después, excepto por el hecho de que se usó la muestra preparada en este ejemplo, se llevó a cabo la misma prueba de inhibición de la liberación de histamina que en el Ejemplo 1 para determinar la velocidad de inhibición de la liberación de histamina. Los resultados se muestran en la tabla 1.

35 **Ejemplo 3**

La muestra (solución acuosa) preparada en el ejemplo 2 se ajustó a un pH de 7,2 a 7,5 y se añadieron 0,5 g de actinasa E (fabricada por Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) como proteasa. La mezcla resultante se agitó a 40 °C durante 3 horas para la reacción.

A continuación, la proteasa en la solución acuosa se inactivó calentando la solución a 90 °C durante 5 minutos y, después, la solución acuosa simplemente se filtró a través de un filtro de 30 mallas para eliminar las sustancias gruesas tales como la membrana ovárica no descompuesta.

Después se añadieron 500 g de carbón activado al filtrado obtenido mediante filtración simple. La mezcla se calentó a 60 °c durante 30 minutos para desgrasar, decolorar y desodorizar el filtrado. El filtrado se filtró usando una prensa de filtro y el filtrado obtenido se concentró a presión reducida y se esterilizó. El filtrado esterilizado se secó mediante secado por aerosol, para dar una muestra.

La muestra preparada en este Ejemplo es un componente de la extracción de la membrana ovárica de *Oncorhynchus keta*. Después, excepto por el hecho de que se usó la muestra preparada en este ejemplo, se llevó a cabo la misma prueba de inhibición de la liberación de histamina que en el Ejemplo 1 para determinar la velocidad de inhibición de la liberación de histamina. Los resultados se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

	Tasa de inhibición de la liberación de histamina (%)
Ejemplo 1	77,9
Ejemplo 2	69,2
Ejemplo 3	69,9

Como se muestra en la Tabla 1, es obvio que tanto la membrana ovárica de pez Salmonidae preparada en los ejemplos 1 y 2 como el componente de la extracción de membrana ovárica obtenido tratando una membrana ovárica de pez Salmonidae con una proteasa en el ejemplo 3 tienen actividades inhibitoras de la liberación de histamina. Por tanto, es obvio que un producto cosmético que tiene una actividad inhibitora de la liberación de histamina se puede obtener usando la membrana ovárica de pez Salmonidae o el componente de la extracción de membrana ovárica de peces Salmonidae. Cabe esperar que dicho producto cosmético tenga un efecto inhibitor de los síntomas de alergia, tal como enrojecimiento y picor, causados por la histamina.

#### Ejemplo 4

Se recolectaron las huevas de los ovarios de *Oncorhynchus keta* de Hokkaido, Japón, y la membrana ovárica se lavó suficientemente con agua. A 100 g de la membrana ovárica lavada se añadió agua purificada (100 ml) y la mezcla se pulverizó usando un mezclador (fabricado por Matsushita Electric Industrial Co., Ltd. con el nombre MXX107) durante un minuto. Este proceso de pulverización se repitió diez veces para dar una sustancia pulverizada. La sustancia pulverizada se trituró adicionalmente usando un mortero y después se filtró a través de una tela metálica de 300 mallas, y la sustancia resultante se usó como muestra.

La muestra preparada en este Ejemplo es una sustancia pulverizada de membrana ovárica de *Oncorhynchus keta*. Después, esta muestra preparada en este ejemplo se sometió a una prueba de inhibición de la síntesis de melanina.

En la prueba de inhibición de la síntesis de melanina, la muestra anterior se diluyó con un medio de cultivo MEM que contiene 10 % de FBS (en lo sucesivo denominado "medio de cultivo MEM que contiene FBS al 10 %") para preparar la solución de prueba A que contiene 100 ppm de la muestra y la solución de prueba B que contiene 300 ppm de la muestra.

Después, células de melanoma de ratón B-16, que sintetizan melanina, se cultivaron en medio de cultivo MEM que contiene FBS al 10 %. Se preparó una suspensión celular que contiene 1 a  $10^5$  células/ml de las células de melanoma de ratón B-16 usando el medio de cultivo. En cada uno de diez matraces de 25 ml se sembraron 5 ml de la suspensión celular. Las células de melanoma de ratón B-16 sembradas en cada matraz se cultivaron a 37 °C durante 24 horas en un incubador con una concentración de CO<sub>2</sub> controlada al 5 %.

Cuando se confirmó que las células de melanoma de ratón B-16 estaban completamente adheridas en cada matraz se extrajo de cada matraz el medio de cultivo MEM que contiene FBS al 10 %. A tres de los diez matraces se añadieron cinco mililitros de la solución de prueba A, a otros tres de los matraces se añadieron 5 ml de la solución de prueba B y a otros tres de los matraces se añadieron 5 ml del medio de cultivo MEM que contiene FBS al 10 % como control. Las células en estos matraces se cultivaron durante seis días. Al tercer día del inicio del cultivo, las soluciones de prueba A y B y el medio de cultivo MEM que contiene FBS al 10 % se intercambiaron con 5 ml de solución de prueba fresca A y B y del medio de cultivo MEM que contiene FBS al 10 %, respectivamente.

Una vez finalizado el cultivo, las células de melanoma de ratón B-16 se trataron con tripsina y se recolectaron.

Las células de melanoma de ratón B-16 recogidas se sometieron a observación para determinar el grado de blancura a simple vista. Los resultados de la observación se muestran en la Tabla 2. En la Tabla 2 "±" representa un grado de blancura sustancialmente igual al del control y "+", "++" y "+++" representa, cada uno, un grado de blancura superior con el incremento en el número de "+".

#### Ejemplo 5

A la muestra preparada en el Ejemplo 4 se añadieron 300 ml de agua purificada y la mezcla se pulverizó usando un emulsionante de presión alta (fabricado por Mizuho Industrial Co., Ltd. con el nombre de Microfluidizer M11 0E/ H) a una presión de tratamiento de 150 MPa. Este proceso de pulverización se repitió dos veces para dar una muestra.

La muestra preparada en este Ejemplo es una sustancia finamente pulverizada de membrana ovárica de *Oncorhynchus keta*. Después, excepto por el hecho de que se usó la muestra preparada en este ejemplo, se llevó a cabo la misma prueba de inhibición de la síntesis de melanina que en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la tabla 2.

#### Ejemplo 6

La muestra (solución acuosa) preparada en el ejemplo 5 se ajustó a un pH de 7,2 a 7,5 y se añadieron 0,5 g de actinasa E (fabricada por Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) como proteasa. La mezcla resultante se agitó a 40 °C durante 3 horas para la reacción.

A continuación, la proteasa en la solución acuosa se inactivó calentando la solución a 90 °C durante 5 minutos y, después, la solución acuosa simplemente se filtró a través de un filtro de 30 mallas para eliminar las sustancias gruesas tales como la membrana ovárica no descompuesta.

Después se añadieron 500 g de carbón activado al filtrado obtenido mediante filtración simple. La mezcla se calentó a 60 °c durante 30 minutos para desgrasar, decolorar y desodorizar el filtrado. El filtrado se filtró usando una prensa de filtro y el filtrado obtenido se concentró a presión reducida y se esterilizó. El filtrado esterilizado se secó mediante secado por aerosol, para dar una muestra.

La muestra preparada en este Ejemplo es un componente de la extracción de la membrana ovárica de *Oncorhynchus keta*. Después, excepto por el hecho de que se usó la muestra preparada en este ejemplo, se llevó a cabo la misma prueba de inhibición de la síntesis de melanina que en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

		Grado de blancura
Ejemplo 4	Solución de prueba A	++
	Solución de prueba B	+++
Ejemplo 5	Solución de prueba A	+++
	Solución de prueba B	+++
Ejemplo 6	Solución de prueba A	++
	Solución de prueba B	+++

Como se muestra en la Tabla 2, es obvio que tanto la membrana ovárica de pez Salmonidae preparada en los ejemplos 4 y 5 como el componente de la extracción de membrana ovárica obtenido tratando una membrana ovárica de pez Salmonidae con una proteasa en el ejemplo 6 tienen actividades inhibitoras de la síntesis de melanina. Por tanto, es obvio que un producto cosmético que tiene una actividad inhibitora de la síntesis de melanina se puede obtener usando la membrana ovárica de pez Salmonidae o el componente de la extracción de membrana ovárica de peces Salmonidae. Cabe esperar que dicho producto cosmético tenga un efecto de mejorar las afecciones de la piel para aclarar la pigmentación y las pecas, la reducción de la matidez de la piel y el blanqueo de la piel.

**Ejemplo 7**

Se recolectaron las huevos de los ovarios de *Oncorhynchus keta* de Hokkaido, Japón, y la membrana ovárica se lavó suficientemente con agua. A 100 g de la membrana ovárica lavada se añadió agua purificada (100 ml) y la mezcla se pulverizó usando un mezclador (fabricado por Matsushita Electric Industrial Co., Ltd. con el nombre MXX107) durante un minuto. Este proceso de pulverización se repitió diez veces para dar una sustancia pulverizada. La sustancia pulverizada se trituró adicionalmente usando un mortero y después se filtró a través de una tela metálica de 300 mallas, y la sustancia resultante se usó como muestra.

A la sustancia resultante se añadieron 300 ml de agua purificada. La mezcla se pulverizó usando un emulsionante de presión alta (fabricado por Mizuho Industrial Co., Ltd. con el nombre de Microfluidizer M110-E/ H) a una presión de tratamiento de 150 MPa. Este procedimiento de pulverización se repitió dos veces para dar una solución acuosa de sustancia finamente pulverizada de membrana ovárica de *Oncorhynchus keta*.

La solución acuosa se ajustó a un pH de 7,2 a 7,5 y se añadieron 0,5 g de actinasa E (fabricada por Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) como proteasa. La mezcla resultante se agitó a 40 °C durante 3 horas para la reacción.

A continuación, la proteasa en la solución acuosa se inactivó calentando la solución a 90 °C durante 5 minutos y, después, la solución acuosa simplemente se filtró a través de un filtro de 30 mallas para eliminar las sustancias gruesas tales como la membrana ovárica no descompuesta.

Después se añadieron 500 g de carbón activado al filtrado obtenido mediante filtración simple. La mezcla se calentó a 60 °c durante 30 minutos para desgrasar, decolorar y desodorizar el filtrado. El filtrado se filtró usando una prensa de filtro y el filtrado obtenido se concentró a presión reducida y se esterilizó. El filtrado esterilizado se concentró a presión reducida, por ejemplo a 60 °C, para dar un componente de extracción de membrana ovárica de *Oncorhynchus keta* como filtrado.

El filtrado concentrado anterior se trató con el emulsionante a presión ultraalta anterior a presión en el intervalo de 980 a 2940 MPa para que el componente de extracción de membrana ovárica de *Oncorhynchus keta* se convierta en granos que tengan un tamaño medio de grano en el intervalo de 200 a 1400 nm. El filtrado tratado con el emulsionante de presión ultra-alta se seca mediante secado por aerosol para dar un componente de extracción de la membrana ovárica de salmón granulado (Muestra A).

Después se preparó una loción para mejorar poros oscurecidos usando la muestra A anterior para tener la composición mostrada en la Tabla 3 de acuerdo con un procedimiento frecuente. De forma similar se preparó una emulsión para mejorar poros oscurecidos usando la muestra A anterior para tener la composición mostrada en la Tabla 4 de acuerdo con un procedimiento frecuente.

5

[Tabla 3]

Componente	Peso (g)
Muestra A	0,5 g
Agua purificada	89,781
1,3-butilenglicol	3,0
Etanol	4,0
Glicerina	2,0
Paraoxibenzoato de metilo	0,1
Aceite de ricino de polioxietileno hidrogenado	0,1
Vitamina E natural	0,019
Hialuronato sódico	0,5
Total	100,0

[Tabla 4]

10

Componente	Peso (g)
Muestra A	0,5 g
Agua purificada	92,375
1,3-butilenglicol	2,0
Glicerina	3,0
1,2-pentanodiol	2,0
Paraoxibenzoato de metilo	0,1
Goma xantana	0,025
Total	100,0

15

La loción y la emulsión para mejorar los poros oscurecidos se aplicaron a toda la cara de cada uno de 12 monitores (mujeres sanas de de 38 a 42 años de edad) dos veces al día (por la mañana y por la noche) después de lavarse la cara durante dos semanas. Ningún monitor tiene alergia al polen ni alergia al salmón, no fuman, no toman drogas, incluidas pastillas, con regularidad, o han recibido atención médica cosmética, no están embarazadas y no están dando el pecho.

20

25

Se tomaron imágenes en blanco y negro de la piel de toda la cara al principio de la aplicación y después de la aplicación durante dos semanas usando un analizador de imágenes de la piel (fabricado por Inforward, Inc. con el nombre de Robo Skin Analyzer) bajo una fuente de luz uniforme. Después se contó el número de poros oscurecidos visibles en las imágenes de la piel. En las imágenes de la piel, cuando se expresó el brillo del color mediante de 0 a 255 niveles en la escala de grises (con el 0 representando el más oscuro y 255 representando el más claro), se definió como "poro" una región con un nivel de escala de grises de 0 a 215 y un área de 0,1 a 0,6 mm<sup>2</sup>. Entre las regiones correspondientes a los poros, una región que contiene una porción que tiene un nivel en la escala de grises de 0 a 40 se definió como "poros oscurecidos visibles".

30

La FIG.1 muestra el valor medio del número de poros oscurecidos visibles de los 12 monitores. La FIG.2 muestra el número de poros que mejoraron en los poros oscurecidos visibles de la FIG. 1. En la FIG. 1, el valor medio antes de la aplicación se menciona como "semana 0" y el valor medio después de la aplicación durante 2 semanas se menciona como "semana 2".



**Ejemplo comparativo 1**

5 E este ejemplo comparativo se preparó una loción (placebo) que no contenía la muestra A para tener la composición mostrada en la Tabla 5 de acuerdo con un procedimiento habitual, en lugar de la loción para mejorar los poros oscurecidos del Ejemplo 7. La loción placebo tenía la misma composición que la loción para mejorar los poros oscurecidos del Ejemplo 7, a excepción de que se usó la misma cantidad de agua purificada en lugar de la muestra A.

10 En este ejemplo comparativo se preparó una loción (placebo) que no contenía la muestra A para tener la composición mostrada en la Tabla 6 de acuerdo con un procedimiento habitual, en lugar de la loción para mejorar los poros oscurecidos del Ejemplo 7. La loción placebo tenía la misma composición que la loción para mejorar los poros oscurecidos del Ejemplo 7, a excepción de que se usó la misma cantidad de agua purificada en lugar de la muestra A.

15 [Tabla 5]

Componente	Peso (g)
Agua purificada	90,281
1,3-butilenglicol	3,0
Etanol	4,0
Glicerina	2,0
1,2-pentanodiol	2,0
Paraoxibenzoato de metilo	0,1
Aceite de ricino polioxietileno hidrogenado	0,1
Vitamina E natural	0,019
Hialuronato sódico	0,5
Total	100,0

[Tabla 6]

Componente	Peso (g)
Agua purificada	92,875
1,3-butilenglicol	2,0
Glicerina	3,0
1,2-pentanodiol	2,0
Paraoxibenzoato de metilo	0,1
Goma xantana	0,1
Vitamina E natural	0,025
Total	100,0

20 La loción placebo y la emulsión para mejorar los poros oscurecidos se aplicaron a toda la cara de cada uno de 12 monitores (mujeres sanas de de 38 a 42 años de edad, diferentes de los monitores del ejemplo 7) dos veces al día (por la mañana y por la noche) después de lavarse la cara durante dos semanas. Ningún monitor tiene alergia al polen ni alergia al salmón, no fuman, no toman drogas, incluidas pastillas, con regularidad, o han recibido atención  
25 médica cosmética, no están embarazadas y no están dando el pecho.

30 El número de poros oscurecidos visibles se contó mediante el mismo procedimiento que el usado en el Ejemplo anterior. La FIG. 1 muestra el valor medio del número de poros oscurecidos visibles de los 12 monitores. La FIG. 2 muestra el número de poros que mejoraron de los poros oscurecidos visibles en la FIG. 1.

Como se muestra en la FIG.1, es obvio que el número poros oscurecidos visibles disminuía con la aplicación de la loción y la emulsión para mejorar los poros oscurecidos de acuerdo con esta realización (Ejemplo 7) durante dos semanas. Por otro lado, es obvio que el número poros oscurecidos visibles aumentaba ligeramente con la aplicación de la loción placebo y la emulsión del Ejemplo Comparativo 1 durante dos semanas.

Como se muestra en la FIG.2, es obvio que el número poros oscurecidos visibles disminuía considerablemente con la loción y la emulsión para mejorar los poros oscurecidos de acuerdo con esta realización.

5 Por tanto, es obvio que la loción y la emulsión para mejorar los poros oscurecidos de acuerdo con esta realización pueden aliviar y mejorar los poros oscurecidos mediante su aplicación a la piel.

Se proporciona una nueva aplicación de un componente extraído de una membrana de ovario de pez Salmonidae  
10 Un producto cosmético de la presente invención contiene una membrana ovárica de pez Salmonidae o un  
componente obtenido tratando la membrana ovárica con una proteasa. El producto cosmético se puede usar como  
cualquiera de (1) un producto cosmético para inhibir los síntomas de alergia de la piel; (2) un producto cosmético  
para mejorar las afecciones de la piel para aclarar la pigmentación y las pecas, la reducción de la matidez de la piel  
y el blanqueo de la piel; (3) un producto cosmético para mejorar los poros oscurecidos. En los productos cosméticos  
15 para mejorar los poros oscurecidos, el componente obtenido tratando la membrana ovárica de pez Salmonidae con  
una proteasa es, preferentemente, granos que tienen un tamaño medio de grano en el intervalo de 200 a 1400 nm.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso cosmético, no terapéutico, de un producto cosmético que comprende una membrana ovárica de pez Salmonidae, para mejorar las afecciones de la piel para aclarar la pigmentación y las pecas, la reducción de la matidez de la piel y el blanqueo de la piel, en el que el producto cosmético tiene una actividad inhibidora de la síntesis de melanina.
- 10 2. Un producto que comprende una membrana ovárica de pez Salmonidae para uso como medicamento para inhibir los síntomas de alergia en la piel, en el que el producto cosmético tiene una actividad inhibidora de la liberación de histamina.
- 15 3. El uso de un producto cosmético de acuerdo con la reivindicación 1, e el que el producto cosmético comprende un componente obtenido tratando una membrana ovárica de pez Salmonidae con una proteasa.
- 20 4. El producto de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende un componente obtenido tratando una membrana ovárica de pez Salmonidae con una proteasa.
5. El uso cosmético, no terapéutico, de un producto cosmético que comprende un compuesto obtenido tratando una membrana ovárica de pez Salmonidae con una proteasa, para mejorar los poros oscurecidos.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el componente obtenido tratando una membrana ovárica de pez Salmonidae con una proteasa es granos que tienen un tamaño medio de grano en el intervalo de 200 a 1400 nm.

FIG.1

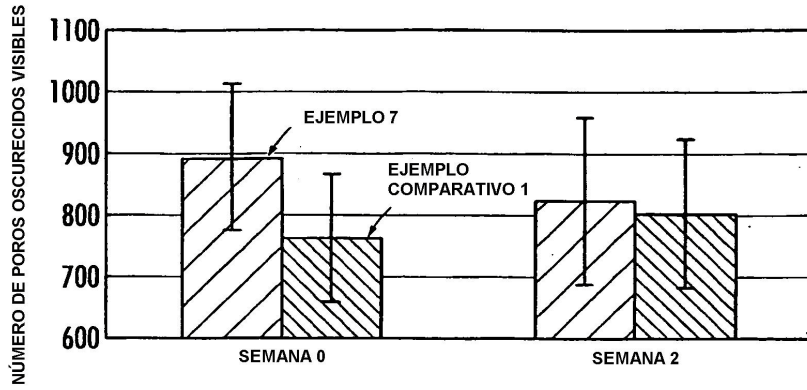


FIG.2

