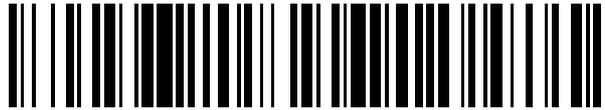


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 551**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61K 35/60 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2010 E 10799943 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2455097**

54 Título: **Material que contiene proteogluano**

30 Prioridad:

16.07.2009 JP 2009168123

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

13.04.2016

73 Titular/es:

**SUNSTAR INC. (50.0%)
3-1 Asahi-machi
Takatsuki-shiOsaka 569-1195, JP y
HIROSAKI UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GOTO, MASASHI;
YAMAMOTO, KAZUSHI;
KATOU, YOUJI;
KATAGATA, YOHTARO y
ITOU, SEIKO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

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

ES 2 566 551 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

Material que contiene proteoglicano.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un material que contiene proteoglicano. Más específicamente, la presente invención se refiere a un material que contiene proteoglicano obtenido a partir de cartílago de pescado.

10 **Antecedentes de la técnica**

El proteoglicano es uno de las macromoléculas biológicas principales para formar el sustrato de la matriz extracelular del tejido conjuntivo, como con el colágeno, etc. El proteoglicano se ha obtenido hasta el momento siendo extraído y aislado a partir de cartílago de mamífero (particularmente, cartílago bovino). Sin embargo, dado que se ha informado del inicio de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE), ha resultado necesaria una fuente alternativa de proteoglicano, y un procedimiento de producción para el mismo.

Está despertando interés el tejido animal acuático como una fuente alternativa para el proteoglicano. Por lo tanto, se ha intentado extraer el proteoglicano a partir del cartílago de animales acuáticos, tales como ballenas o tiburones. Sin embargo, debido a las restricciones rigurosas impuestas sobre estos animales acuáticos, ha resultado difícil producir una gran cantidad de proteoglicano. Sin embargo, la extracción y el aislamiento del proteoglicano resulta complicada, y los disolventes utilizados para la extracción presentan ciertos niveles de toxicidad. Por lo tanto, la utilización de los productos de proteoglicano es limitada, y existen dificultades en su utilización como materiales de productos alimenticios y cosméticos.

Bajo estas circunstancias, se ha producido una investigación activa en diversos procedimientos de producción de proteoglicano. Por ejemplo, el documento de patente 1 divulga un procedimiento para purificar el proteoglicano. En este procedimiento, el cartílago nasal del salmón es pulverizado y desgrasado para obtener polvo seco desgrasado, que es sometido a continuación a extracción utilizando un disolvente. El extracto grueso obtenido es aislado y purificado, seguido por una diálisis. Sin embargo, este procedimiento utiliza un disolvente orgánico que presenta un nivel determinado de toxicidad, tal como cloroformo o metanol. Otro problema de este procedimiento consiste en que el olor a pescado persiste en el proteoglicano resultante.

El documento de patente 2 divulga un procedimiento para purificar proteoglicano a partir de cartílago nasal de salmón que utiliza un ácido acético como disolvente de extracción. Además, el documento de patente 3 sugiere una capacidad de proliferación de fibroblastos, y un efecto de promoción de la síntesis del ácido hialurónico del proteoglicano producido mediante el documento de patente 2.

Como se ha explicado anteriormente, existe todavía investigación en curso respecto a la producción, utilización y efectos del proteoglicano.

Listado de citas

Documentos de patente

45 [Documento de patente 1] Publicación de patente sin examinar japonesa nº 2001-172296
 [Documento de patente 2] Publicación de patente sin examinar japonesa nº 2002-069097
 [Documento de patente 3] Publicación de patente sin examinar japonesa nº 2008-247803

50 El documento EP 1570845 A1 se refiere a principios activos farmacéuticos que comprenden un sacárido ácido, un ácido poliacrílico, ácido clorogénico y un producto tratado por oxidación del ácido clorogénico, o un extracto derivado de las algas. Este documento no describe un material que contiene proteoglicano.

55 El documento JP 2005 075740 A se refiere a una composición inmunoestimulante que contiene un extracto de hongos siendo obtenido dicho extracto utilizando un disolvente hidrófilo. Las composiciones preferidas comprenden un extracto que contiene sacárido ácido y péptido ácido que presenta un peso molecular medio de 5.000-10.000.

60 El documento JP 2006 143605 A describe una preparación que contiene oligosacárido, glucosamina, condroitina, ácido hialurónico, ceramida sacárida, vitamina C y péptido de colágeno de origen animal.

Sumario de la invención

Problema técnico

65 Un objetivo de la presente invención consiste en producir una composición que contiene proteoglicano nueva (material que contiene proteoglicano) a partir de cartílago de pescado utilizando un disolvente menos tóxico; y

descubrir una utilización nueva y un efecto superior del material que contiene proteoglicano.

Solución al problema

5 Inesperadamente, los inventores de la presente invención descubrieron que un extracto que contiene un componente sacárido ácido, que se obtiene extrayéndose a partir de cartilago de pescado utilizando un procedimiento particular, proteoglicano contenido que presenta un peso molecular superior al del proteoglicano conocido hasta el momento. Además, los inventores descubrieron adicionalmente que el extracto mencionado anteriormente presenta unos efectos superiores diversos. Tras algunas tentativas de mejorar adicionalmente el extracto, los inventores completaron la presente invención.

15 En la presente memoria, se hace referencia al sacárido ácido y al compuesto que contiene sacárido ácido como un ingrediente como un componente sacárido ácido. Dado que el proteoglicano presenta una estructura en la que se unen el sacárido ácido y la proteína, el proteoglicano corresponde al componente sacárido ácido; más específicamente, el proteoglicano es un tipo de componente sacárido ácido. El material que contiene proteoglicano de la presente invención comprende proteoglicano y sacárido ácido como componentes sacáridos ácidos. Por lo tanto, puede hacerse referencia asimismo al material que contiene proteoglicano de la presente invención como una composición que contiene sacárido ácido.

20 La presente invención incluye, por ejemplo, los materiales que contienen proteoglicano y las composiciones que contienen materiales que contienen proteoglicano tal como se describe en los puntos siguientes.

[Punto 1]

25 Un material que contiene proteoglicano que comprende proteoglicano y sacárido ácido como componentes sacáridos ácidos obtenido a partir de cartilago de pescado por extracción, en el que el material que contiene proteoglicano comprende un componente sacárido ácido que presente un peso molecular no inferior a 5.000 kDa.

[Punto 2]

30 El material que contiene proteoglicano según el punto 1, en el que 50% en masa o más de los componentes sacáridos ácidos presentan un peso molecular no inferior a 2.000 kDa.

[Punto 3]

35 El material que contiene proteoglicano según cualquiera de los puntos 1 o 2, en el que 20% en masa o más de los componentes sacáridos ácidos presentan un peso molecular no inferior a 10.000 kDa.

[Punto 4]

40 El material que contiene proteoglicano según cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que 20% en masa o más de los componentes sacáridos ácidos es proteoglicano.

[Punto 5]

45 Un producto alimenticio o composición de bebida que comprende el material que contiene proteoglicano según cualquiera de los puntos 1 a 4.

[Punto 6]

50 Una composición oral que comprende el material que contiene proteoglicano según cualquiera de los puntos 1 a 4.

[Punto 7]

55 Una composición cosmética que comprende el material que contiene proteoglicano según cualquiera de los puntos 1 a 4.

Efectos ventajosos de la invención

60 El material que contiene proteoglicano de la presente invención proporciona varios efectos ventajosos para la hidratación de la piel y el antienvjecimiento, que incluyen un efecto de la proliferación de fibroblastos de la piel excelente, un efecto de potenciación y mejora de la función de barrera de la piel, un efecto de potenciación y mejora de la capacidad de la piel para producir colágeno, y efecto de inhibición de engrosamiento de la dermis, y similares.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1]

5 Unas vistas esquemáticas que representan un procedimiento de determinación de un área pico que representa el proteoglicano de la presente invención.

[Figura 2]

10 Unas gráficas que representan los resultados de un análisis cuantitativo respecto a las cantidades de sacárido ácido y proteína contenidas en cada una de la pluralidad de fracciones eluidas de 1 ml obtenidas a partir de las muestras derivadas a partir del polvo de cartílago nasal de salmón (la gráfica izquierda) y un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón (la gráfica derecha) mediante cromatografía de filtración en gel (se utiliza una columna de relleno de Sepharose CL-2B). El análisis cuantitativo se realiza según el procedimiento de ácido sulfúrico-carbazol y el procedimiento de absorción de UV.

[Figura 3]

20 Unas gráficas que representan los resultados de un análisis cuantitativo respecto a la cantidad de sacárido ácido contenida en cada una de una pluralidad de fracciones eluidas obtenidas a partir de proteoglicano disponible comercialmente (PG-K) y glucosaminoglicano disponible comercialmente (PG-M; disponible comercialmente como condroitina) mediante cromatografía de filtración en gel. La gráfica izquierda representa los resultados de PG-M, y la gráfica derecha representa los resultados de PG-K.

25 [Figura 4]

Unas gráficas que representan los resultados de un análisis cuantitativo respecto a la cantidad de sacárido (es decir, cantidad de dextrano) contenida en cada una de una pluralidad de fracciones eluidas obtenidas a partir de marcadores de peso molecular de dextrano mediante una cromatografía de filtración en gel. El análisis cuantitativo se realiza mediante un procedimiento de ácido sulfúrico-fenol.

30 [Figura 5]

Una gráfica que representa una curva analítica basada en la cantidad de líquido en la que se eluye cada marcador de peso molecular, según los resultados de la figura 4.

[Figura 6]

40 Una gráfica que resume los resultados de medición de las cantidades de sacárido ácido representados en la figura 1 y la figura 2.

[Figura 7]

45 Una gráfica que representa un análisis cuantitativo respecto a la cantidad de sacárido ácido contenida en cada una de una pluralidad de fracciones eluidas de 1 ml obtenidas a partir de las muestras derivadas a partir de polvo de cartílago nasal de salmón mediante cromatografía de filtración en gel (se utiliza una columna de relleno Sephacryl S-1000 SF). El análisis cuantitativo se realiza mediante el procedimiento de carbazol-ácido sulfúrico.

50 [Figura 8]

Una gráfica que representa un análisis de capacidades para proliferar los fibroblastos de piel humana de polvo de cartílago nasal de salmón y un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón.

55 [Figura 9]

Una gráfica que representa un análisis de una influencia sobre la función de barrera de la piel (valor TEWL) mediante la administración oral de polvo de cartílago nasal de salmón y un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón.

60 [Figura 10]

Una gráfica que representa un análisis de una influencia sobre la elasticidad de la piel mediante la administración oral de polvo de cartílago nasal de salmón y un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón.

[Figura 11]

Una gráfica que representa un análisis de una influencia de la capacidad para producir colágeno mediante la administración oral de polvo de cartílago nasal de salmón, y un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón.

[Figura 12]

Una gráfica que representa las mediciones del grosor de la dermis del lomo de ratones a los que se ha administrado oralmente polvo de cartílago nasal de salmón, y un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón, para el análisis de una influencia sobre el engrosamiento de la dermis mediante estas sustancias.

[Figura 13]

Una gráfica que representa un análisis de una influencia sobre la función de barrera de la piel (valor TEWL) mediante la administración transdérmica de polvo de cartílago nasal de salmón y un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón.

[Figura 14]

Un procedimiento de fraccionamiento de un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón mediante una cromatografía de intercambio de iones y una cromatografía de filtración en gel.

[Figura 15]

Una gráfica que representa un análisis del efecto de la proliferación celular de cada fracción un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón; específicamente, una gráfica que representa el número celular de cada fracción tras 7 días de la adición de cada muestra (50 µg/ml). Un "extracto de agua PGNP" es un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón.

[Figura 16]

Una gráfica que representa un análisis del efecto de la proliferación celular de cada fracción de un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón; específicamente, una gráfica que representa el número celular de cada fracción tras 7 días de adición de cada muestra (10 µg/ml).

Descripción de las formas de realización

La presente invención se describe con mayor detalle a continuación. En adelante, los pesos moleculares y los pesos moleculares medios del sacárido ácido y del proteoglucono se basan en los valores de medición obtenidos en la cromatografía de filtración en gel que utiliza dextrano como un marcador de peso molecular.

El material que contiene proteoglucono de la presente invención se produce a partir de cartílago de pescado. Los ejemplos de pescado incluyen, de manera no limitativa, trucha (salmón rosado, salmón japonés, salmón satsukimasu, etc.), salmones (salmón chum, salmón rojo, salmón plateado, salmón real, trucha arco iris, etc.), tiburones, y bacalaos. Resultan preferidos los *Oncorhynchus* (salmonidae), en particular, los salmones y la trucha. El cartílago que se debe utilizar no se encuentra tampoco limitado; sin embargo, resulta preferido el cartílago de cabeza, en particular el cartílago nasal. Además, debido a que las cabezas de pescado resultan descartadas habitualmente cuando el pescado es tratado como producto alimenticio, el coste de las cabezas de pescado es bajo, y puede suministrarse de manera estable una gran cantidad de cabeza de pescado.

En la presente invención, "componente sacárido ácido" se refiere a un sacárido ácido o a un compuesto que contiene sacárido ácido como un ingrediente. El material que contiene proteoglucono de la presente invención contiene un componente sacárido ácido (es decir, sacárido ácido o un componente que contiene sacárido ácido como un ingrediente).

En la presente memoria, "sacárido ácido" es un polisacárido que contiene un ácido urónico. Los ejemplos de sacárido ácido contenido en el material que contiene proteoglucono de la presente invención incluyen glucosaminoglucanos tales como ácido hialurónico, condroitina y similares. Con la excepción del ácido hialurónico, el glucosaminoglucano se encuentra presente generalmente siendo enlazado de manera covalente con la proteína (es decir, como proteoglucono).

El proteoglucono es un ejemplo específico del compuesto que contiene sacárido ácido como un ingrediente. El proteoglucono presenta una estructura en la que están enlazados de manera covalente el glucosaminoglucano y la proteína. El glucosaminoglucano que forma el proteoglucono es un sacárido ácido que consiste en una unidad disacárida sulfatada de repetición. Específicamente, sus ejemplos incluyen sulfato de condroitina, sulfato de

dermatano, y sulfato de heparano. Es decir, el proteoglucano es un compuesto que presenta una estructura en la que están enlazados la proteína y el sacárido ácido.

5 En la estructura de disacárido de repetición del componente sacárido ácido, generalmente, uno de los disacáridos es un aminoazúcar, y el otro es un ácido urónico. Por lo tanto, puede realizarse la detección de los componentes sacáridos ácidos utilizando un procedimiento carbazol-ácido sulfúrico, que es uno de los procedimientos habituales para la detección de los ácidos urónicos.

10 El procedimiento carbazol-ácido sulfúrico se realiza añadiendo una disolución de carbazol, que es un componente de color del ácido glucurónico (Glc A) y ácido idurónico, es decir, ácido urónico, a una muestra de medición, que mide la absorbancia utilizando un espectrofotómetro, y representando una curva analítica utilizando la disolución estándar de ácido glucurónico que presenta una concentración específica, descubriendo así el contenido de ácido glucurónico en la muestra. Más específicamente, el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico puede realizarse como se expone a continuación.

15 Se disponen 2,5 ml de un reactivo obtenido disolviendo 0,95 g de borato sódico decahidratado en 100 ml de un ácido sulfúrico concentrado en un tubo de ensayo, y refrigerado con hielo. Se extienden sobre el mismo cuidadosamente 0,5 ml de un objeto de ensayo (que contiene de 4 a 40 µg de ácido urónico). La mezcla es agitada adecuadamente mientras es refrigerada con hielo, manteniéndose así a temperatura ambiente o inferior. Después de que se haya cubierto el tubo de ensayo con un tapón de bola de cristal, el tubo de ensayo se calienta en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos, seguido de una refrigeración con agua para reducir la temperatura hasta la temperatura ambiente. A continuación, se añaden 0,1 ml de un reactivo obtenido disolviendo 125 mg de carbazol en 100 ml de alcohol metílico anhidro y se mezclan con los mismos, y la mezcla es calentada en un baño de agua en ebullición durante 15 minutos. A continuación, la mezcla se refrigera con agua hasta la temperatura ambiente, y se mide una absorbancia a 530 nm. En el ensayo en blanco, se utilizan 0,5 ml de agua destilada. Simultáneamente, se representa una curva analítica utilizando un ácido glucurónico.

20 El peso molecular medio del componente sacárido ácido contenido en el material que contiene proteoglucano de la presente invención es de generalmente aproximadamente 2.000 kDa a 40.000 kDa, preferentemente 2.500 kDa a 30.000 kDa, más preferentemente 3.000 kDa a 20.000 kDa, todavía más preferentemente 3.000 kDa a 10.000 kDa, y aún más preferentemente 4.000 kDa a 8.000 kDa.

25 El material que contiene proteoglucano de la presente invención contiene un componente sacárido ácido que presenta un peso molecular no inferior a 5.000 kDa.

30 La proporción de un componente sacárido ácido que presente un peso molecular no inferior a 2.000 kDa en el material que contiene proteoglucano de la presente invención es preferentemente no inferior a 50% en masa, más preferentemente no inferior a 55% en masa, todavía más preferentemente no inferior a 60% en masa, y aún más preferentemente no inferior a 65% en masa.

35 El proteoglucano contenido en el material que contiene proteoglucano de la presente invención presenta un peso molecular (MW) significativamente superior al del proteoglucano disponible en la actualidad. Más específicamente, incluso poco proteoglucano en el material que contiene proteoglucano de la presente invención presenta un peso molecular de por lo menos aproximadamente 5.000 kDa a 6.000 kDa o más. Por lo tanto, el material que contiene proteoglucano de la presente invención contiene un proteoglucano que presenta un peso molecular de aproximadamente 5.000 kDa o más. Por ejemplo, el material que contiene proteoglucano de la presente invención contiene un proteoglucano que presenta una cantidad molecular de aproximadamente 5.000 kDa a 100.000 kDa, preferentemente 5.000 kDa a 90.000 kDa, más preferentemente 5.000 kDa a 80.000 kDa, todavía más preferentemente 5.000 kDa a 70.000 kDa. Además, aunque el peso molecular medio del proteoglucano contenido en el material que contiene proteoglucano de la presente invención no está limitado particularmente, el peso molecular medio es de generalmente aproximadamente 6.000 kDa a 60.000 kDa, preferentemente aproximadamente 7.000 kDa a 50.000 kDa, más preferentemente aproximadamente 9.000 kDa a 40.000 kDa.

40 La proporción del proteoglucano que presenta un peso molecular de 6.000 kDa o superior (más preferentemente 10.000 kDa o superior) en el material que contiene proteoglucano de la presente invención es preferentemente no inferior a 20% en masa o más, más preferentemente no inferior a 30% en masa.

45 El material que contiene proteoglucano de la presente invención contiene preferentemente un componente sacárido ácido en una cantidad de, sobre una base de masa seca, 15 a 70% en masa, más preferentemente 30 a 70% en masa. Además, el material que contiene proteoglucano de la presente invención contiene preferentemente proteoglucano en una cantidad de, sobre una base de masa seca, 4 a 40% en masa, más preferentemente 10 a 40% en masa, todavía más preferentemente 15 a 40% en masa.

50 El peso molecular del componente sacárido ácido o proteoglucano contenido en el material que contiene proteoglucano de la presente invención puede medirse utilizando cromatografía o similar. En particular, el peso molecular es medido preferentemente mediante cromatografía de filtración en gel. Más específicamente, por

ejemplo, puede utilizarse una matriz de gel de agarosa (agarosa, agarosa reticulada, etc.) como soporte de la columna, y puede utilizarse un amortiguador fosfato (preferentemente que contenga cloruro sódico) como amortiguador. Mediante la filtración en gel del material que contiene proteoglucono, puede determinarse el peso molecular del componente sacárido ácido o proteoglucono contenido en la composición según el volumen de elución antes de la elución del componente sacárido ácido o proteoglucono.

Debido a que el proteoglucono presenta una estructura en la que están enlazados covalentemente el glucosaminoglucono (mucopolisacárido) y la proteína, puede detectarse la elución del proteoglucono en la cromatografía monitorizando el sacárido ácido y la proteína. Más específicamente, se superponen un cromatograma obtenido monitorizando el sacárido ácido y un cromatograma obtenido monitorizando la proteína para confirmar si existe un pico solapado en sustancialmente el mismo rango de eluido en los dos cromatogramas. Si se descubre dicho pico, el pico es considerado como la detección del proteoglucono. Por ejemplo, el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico puede utilizarse para monitorizar el sacárido ácido. La fracción eluida de la cromatografía se divide en fracciones separadas de una cantidad predeterminada, y la cantidad de sacárido ácido contenida en cada fracción es determinada utilizando el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico. Además, por ejemplo, puede realizarse la monitorización de la proteína según el procedimiento de absorción de UV (en el que se determina la cantidad de proteína midiendo las absorbancias del triptófano, de la tirosina, y de la fenilalanina que presentan absorciones próximas a 280 nm), reacción de ninhidrina, procedimiento BCA, método de Bradford, método de Lowry, método de biuret, y similares. De entre los mismos, se realiza fácilmente el análisis cuantitativo utilizando el procedimiento de absorción de UV.

Además, puede determinarse el peso molecular a partir de la cantidad de eluido, como se expone a continuación. Se somete a cromatografía de filtración en gel un marcador de peso molecular de la misma manera, y se mide la medición de líquido a la que el marcador de peso molecular es eluido para representar una curva analítica (cantidad de eluido vs peso molecular). Se selecciona de manera apropiada un marcador de peso molecular adecuado y adquirido en consideración al peso molecular del material que contiene proteoglucono o el tipo de matriz de gel que se va a utilizar. Por ejemplo, puede utilizarse un marcador de peso molecular realizado en dextrano. Dicho marcador de peso molecular puede adquirirse en Sigma-Aldrich Co., etc.

Además del componente sacárido ácido, el material que contiene proteoglucono de la presente invención contiene asimismo otros componentes derivados de cartilago de pescado. Sus ejemplos incluyen las proteínas tales como colágeno, y sales.

En la presente invención, el peso molecular medio de una sustancia designa un peso molecular medio determinado como se expone a continuación. Se traza una línea (bisectriz) perpendicular al eje horizontal (cantidad de eluido) que divide el área pico en el cromatograma de la sustancia obtenido mediante análisis utilizando cromatografía de filtración en gel, y se determina un peso molecular medio a partir de la cantidad de eluido correspondiente a la posición de la bisectriz, utilizando una curva analítica. Más específicamente, el peso molecular medio de una sustancia designa un peso molecular determinado según el procedimiento divulgado en la sección "Análisis del peso molecular de los materiales que contienen proteoglucono" de los ejemplos.

Por ejemplo, se halla el peso molecular medio del componente sacárido ácido contenido en el material que contiene proteoglucono aislando el material que contiene proteoglucono mediante cromatografía de filtración en gel, trazando una línea que divide el área del cromatograma obtenido monitorizando el componente sacárido ácido contenido en el mismo, y se descubre el peso molecular medio determinando un peso molecular a partir de la cantidad de eluido correspondiente a la posición de la bisectriz utilizando una curva analítica (es decir, sustituyendo la cantidad de eluido en la ecuación de la curva analítica). Se describe con mayor detalle a continuación la monitorización del componente sacárido ácido. El material que contiene proteoglucono es sometido a un análisis por cromatografía de filtración en gel, seguido por la elución a una velocidad determinada, y se divide el eluido resultante en dos fracciones separadas de una cantidad predeterminada. Las fracciones se someten a un análisis cuantitativo, y la cantidad medida de sacárido ácido en cada eluido (fracción) es representada para crear un cromatograma.

Además, el peso molecular medio del proteoglucono contenido en el material que contiene proteoglucono es descubierto dibujando una línea que divide el área pico que indica proteoglucono en un cromatograma obtenido mediante un análisis por cromatografía de filtración en gel del material que contiene proteoglucono, y se descubre el peso molecular medio determinando un peso molecular a partir de la cantidad de eluido correspondiente a la posición de la bisectriz utilizando una curva analítica.

Como se describe anteriormente, el pico que indica proteoglucono corresponde a un pico que está sustancialmente solapado cuando se superponen un cromatograma obtenido mediante la monitorización del sacárido ácido y un cromatograma obtenido monitorizando la proteína.

Si el ascenso y la caída del pico que indica proteoglucono no puede especificarse debido a que se superponen con los picos de los otros componentes sacáridos ácidos, el ascenso y la caída son estimados sobre la base de la forma del pico. Utilizando los valores estimados del ascenso y la caída, se descubren el peso molecular y el peso molecular medio. La figura 1 representa un ejemplo de dicha estimación. La figura 1 es una vista esquemática que

representa un procedimiento para estimar la forma del pico cuando no puede especificarse la caída del pico. En la figura 1, la línea se extiende dibujando una curva de pendiente descendente, determinando así la forma del pico.

5 Para el componente sacárido ácido y un proteoglucano, el peso molecular o el peso molecular medio se descubren preferentemente analizando un cromatograma obtenido monitorizando el sacárido ácido.

Además, recogiendo únicamente la fracción correspondiente al pico que indica proteoglucano durante la cromatografía de filtración en gel, resulta posible purificar el proteoglucano contenido en el material que contiene proteoglucano de la presente invención. Además, recogiendo desde la fracción inicial a la fracción correspondiente al pico que indica proteoglucano, resulta posible obtener un material que contiene proteoglucano que presenta un peso molecular medio más superior.

15 La proporción de proteoglucano en el componente sacárido ácido contenido en el material que contiene proteoglucano de la presente invención es generalmente no inferior a 20% en masa, preferentemente 20 a 60% en masa, más preferentemente 25 a 55% en masa, todavía más preferentemente 30 a 50% en masa. La proporción de proteoglucano en el componente sacárido ácido puede descubrirse a partir del cromatograma utilizado para descubrir el peso molecular del componente sacárido ácido o proteoglucano. Más específicamente, descubriendo la proporción del área pico que representa el proteoglucano de entre el área total del cromatograma obtenido monitorizando el componente sacárido ácido del material que contiene proteoglucano, resulta posible descubrir la proporción de proteoglucano en el componente sacárido ácido.

25 Como se ha descrito anteriormente, el material que contiene proteoglucano de la presente invención es producido a partir de cartílago de pescado. Más específicamente, el material que contiene proteoglucano de la presente invención puede producirse desgrasando el cartílago de pescado utilizando etanol. Además, el material que contiene proteoglucano puede producirse extrayéndose del cartílago de pescado desgrasado mediante extracción de agua.

Por ejemplo, el material que contiene proteoglucano es producido mediante las etapas siguientes.

30 Etapas (1): Etapa de tratamiento con agua

Se sumerge el tejido de pescado que contiene cartílago (por ejemplo, cabeza de pescado) en agua durante de varios minutos hasta varios días a temperatura ambiente o a una temperatura baja (aproximadamente 0 a 40°C). Se permite que el tejido permanezca inmóvil en el agua, es agitado durante su inmersión, y es agitado junto con el agua utilizando un mezclador en línea, etc. La cantidad de agua no está particularmente limitada; sin embargo, resulta preferido utilizar una cantidad suficiente de agua de manera que la totalidad del tejido que contiene cartílago se sumerja en la misma. Dicha inmersión completa del tejido elimina el olor a pescado del tejido, y permite la eliminación sencilla de las partes diferentes al cartílago debido a que el tejido se hincha mediante la infiltración del agua. Antes de la inmersión en agua, resulta posible cortar o rajarse el tejido que contiene cartílago de antemano, o separar las partes extraíbles del tejido diferentes al cartílago.

40 Cuando el tejido es desodorizado e hinchado de manera deseable mediante la inmersión suficiente en agua, los lípidos, etc., son extraídos del tejido de pescado que contiene cartílago (es decir, se desgrasa el tejido que contiene cartílago). Los lípidos extraídos se disuelven o suspenden en la capa de agua, o flotan sobre la capa de agua como una capa lipídica. Eliminando la capa de agua y la capa lipídica, son eliminados los lípidos contenidos en el tejido que contiene cartílago. Resulta posible asimismo eliminar estas sustancias indeseadas mediante centrifugación.

45 Etapas (2): Etapa de tratamiento con etanol

Tras eliminar la capa lipídica y la capa de agua, se aísla el residuo resultante (tejido de cartílago). Se añade etanol al residuo, y los lípidos son eliminados adicionalmente mediante extracción. Mediante la eliminación adicional de los lípidos, resulta posible eliminar de manera más fiable el olor. Puede utilizarse asimismo etanol hidratado. Además, resulta preferido pulverizar el residuo (tejido de cartílago) antes de la adición del disolvente orgánico. El procedimiento para pulverizar el tejido no está limitado. Por ejemplo, puede realizarse la pulverización utilizando un dispositivo que pueda pulverizar finamente los materiales de cartílago, tal como un molino de bolas, molino pendular, moledora de baja temperatura, moledora de refrigeración, molino de rotor, mezcla de molienda, molino mezclador, y similares. El tamaño de partícula del tejido pulverizado es de preferentemente, pero no limitado a, aproximadamente 10 a 500 µm, más preferentemente aproximadamente 50 a 250 µm. Puede medirse el tamaño de partículas según el procedimiento de dispersión por difracción de láser.

60 Por ejemplo, esta etapa puede realizarse sumergiendo el tejido de cartílago (preferentemente, tejido de cartílago pulverizado) obtenido anteriormente en etanol en una cantidad suficiente para sumergir totalmente el tejido; agitar el tejido sumergido, o permitir que permanezca inmóvil; y eliminar a continuación el disolvente. La inmersión se realiza preferentemente varias veces (por ejemplo, 2 a 5 veces). Resulta asimismo posible eliminar los lípidos mediante la circulación de etanol. Este procedimiento es realizado más preferentemente con el extractor Soxhlet o similar. Tras dicho tratamiento, se separan los sólidos. Los sólidos recogidos pueden secarse mediante secado por aire o similar para eliminar completamente el disolvente orgánico.

Los sólidos así obtenidos son utilizados como un material que contiene proteoglucano .

5 Un ejemplo con mayor detalle de la etapa (2) anterior puede ser el procedimiento siguiente que comprende las etapas [1] a [9].

[1] Se elimina el tejido no pertinente tal como piel o hueso del cartílago nasal de salmón, y se pulveriza el cartílago resultante con una picadora de carne.

10 [2] Se añade al cartílago nasal de salmón pulverizado agua corriente o agua purificada que presenta un pH de 6 a 7,5 en una cantidad tal que resulte igual a o el doble de la cantidad (volumen) del cartílago, y la mezcla es agitada de manera suficiente a 40°C o menos.

15 [3] Tras la agitación, la mezcla se somete a centrifugación utilizando una centrífuga para recoger los sólidos.

[4] Las etapas [2] y [3] se realizan una o dos veces.

[5] Los sólidos resultantes son pulverizados adicionalmente finamente con un pulverizador en húmedo.

20 [6] Se añade el etanol que presenta una pureza de 95% o superior en una cantidad (volumen) que es aproximadamente diez veces la cantidad de cartílago al cartílago nasal de salmón pulverizado finamente, y la mezcla se agita suficientemente a 40°C o menos.

25 [7] Tras la agitación, la mezcla se somete a centrifugación utilizando una centrífuga para recoger los sólidos.

[8] Las etapas [6] y [7] se realizan de 1 a 3 veces.

[9] Los sólidos son secados, cuando resulte necesario.

30 En la etapa [5], puede realizarse una pulverización fina tras la liofilización de los sólidos resultantes.

Etapa (3): Etapa de extracción de agua

35 Como el material que contiene proteoglucano de la presente invención, resulta más preferido utilizar un extracto que resulta de una extracción de agua adicional. Por lo tanto, los sólidos obtenidos en la etapa (2) son sometidos adicionalmente preferentemente a extracción de agua. Por ejemplo, los sólidos obtenidos en la etapa (2) se sumergen en una cantidad suficiente de agua para sumergirse completamente en la misma, la mezcla se agita, y se elimina la materia insoluble. De esta manera, se utiliza la disolución obtenida o un producto seco de la misma como un material que contiene proteoglucano. El pH del agua que se debe añadir es de generalmente 5,5 a 8,0, preferentemente 6,0 a 7,5, más preferentemente 6,5 a 7,5. Más específicamente, por ejemplo, el tejido es agitado mientras se encuentra sumergido en agua durante aproximadamente 30 minutos a 6 horas, o agitado junto con el agua utilizando un mezclador en línea o similar; y se elimina la materia insoluble. Tras la eliminación de la materia insoluble, resulta posible realizar el secado mediante un procedimiento habitual. Además, resulta posible añadir etanol en una cantidad de dos a diez veces (volumen) tras eliminar la materia insoluble, recogiendo así los sólidos resultantes. En este caso, puede añadirse cloruro sódico antes de la adición de etanol.

45 Un ejemplo con mayor detalle de la etapa (3) anterior puede ser el procedimiento siguiente que comprende las etapas [10] a [12], que son realizadas tras las etapas [1] a [9].

50 [10] El agua purificada que presenta un valor de pH de 6 a 7,5 en una cantidad (volumen) que es aproximadamente igual o el doble que la del producto seco obtenido en la etapa [9] se añade al producto seco, y la mezcla es agitada suficientemente a 40°C o menos durante de aproximadamente 30 minutos a 48 horas.

55 [11] La centrifugación se realiza para eliminar los sólidos.

[12] Los sólidos se secan, como resulte necesario..

60 Resulta posible asimismo añadir etanol tras la etapa [11], agitar la mezcla, y recoger los sólidos resultantes.

Como se describe anteriormente, el material que contiene proteoglucano de la presente invención puede producirse asimismo mediante las etapas (A) y (B), o mediante las etapas (A) a (C).

65 (A) Una etapa de purificación del cartílago de pescado.

(B) Una etapa de eliminación de lípidos del cartílago de pescado utilizando un disolvente orgánico.

(C) Una etapa de realizar adicionalmente una extracción de agua respecto al cartílago de pescado desgrasado, recogiendo así un extracto.

5 Las etapas (A), (B) y (C) corresponden respectivamente a las etapas (1), (2) y (3) descritas anteriormente.

10 El material que contiene proteoglucano de la presente invención puede utilizarse adecuadamente para el antienviejimiento de la piel. La piel se expone constantemente a varios tipos de daño. Por ejemplo, en la capa dérmica, la función de barrera de la epidermis disminuye debido a factores externos (por ejemplo, la radiación óptica tal como la ultravioleta) o factores internos (por ejemplo, el envejecimiento). Dicho daño produce un aumento de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL), causando así piel seca o áspera. Además, por la misma razón, pueden producirse en la capa dérmica una disminución de la capacidad para producir colágeno, una disminución en la elasticidad de la piel, o el engrosamiento dérmico, facilitando así el endurecimiento de la piel. Esto puede derivar en arrugas o similar.

15 El material que contiene proteoglucano de la presente invención presenta varios efectos (efectos ventajosos en términos de hidratación de la piel o antienviejimiento, tal como el efecto de proliferación de fibroblastos de la piel, los efectos de potenciación y mejora de la función de barrera de la piel, los efectos de potenciación y mejora de la capacidad de la piel para producir colágeno, el efecto de inhibición del engrosamiento de la dermis, y similares) para suprimir o tratar dichos síntomas cutáneos. En particular, el material que contiene proteoglucano de la presente invención resulta apropiado para prevenir o tratar los síntomas cutáneos mencionados anteriormente mediante radiación óptica (en particular, radiación ultravioleta).

20 La utilización del material que contiene proteoglucano de la presente invención no resulta limitada; sin embargo, el material que contiene proteoglucano de la presente invención resulta particularmente útil para los productos en la industria del cuidado bucal, la industria cosmética y la industria alimenticia y de bebidas. Así, la presente invención incluye composiciones orales que contienen el material que contiene proteoglucano de la presente invención, composiciones cosméticas que contienen el material que contiene proteoglucano de la presente invención, y composiciones alimenticias y de bebida que contienen el material que contiene proteoglucano de la presente invención.

25 Las composiciones orales que contienen el material que contiene proteoglucano (puede hacerse referencia a continuación a estas composiciones orales como composiciones orales de la presente invención) utilizadas para los productos de cuidado bucal pueden producirse mediante la combinación apropiada del material que contiene proteoglucano de la presente invención con otros componentes (por ejemplo, abrasivos, agentes espumantes, limpiadores, tensioactivos, agentes humectantes, ajustadores de pH, espesantes, agentes saborizantes, y similares) utilizados generalmente para las composiciones orales. Los ejemplos de los productos de composición oral incluyen agentes de pasta, pomadas, geles, bálsamos, aerosoles, suplementos, líquidos, enjuagues bucales, pasta, chicles, grageas y comprimidos, que pueden elaborarse mediante los procedimientos habituales.

30 Dichas composiciones orales de la presente invención pueden utilizarse pulverizándose en el interior de la cavidad bucal, o como un enjuague bucal. Mediante dichas aplicaciones, las composiciones orales hacen proliferar, en particular, los fibroblastos en la cavidad bucal, potenciando y mejorando así la función de barrera de la piel y la capacidad para producir colágeno. Con dichas, ventajas, las composiciones orales de la presente invención son utilizadas de manera apropiada para la regeneración y antienviejimiento del tejido bucal.

35 La cantidad de componente sacárido ácido contenido en el material que contiene proteoglucano de las composiciones orales de la presente invención no está particularmente limitada; sin embargo, la cantidad es de generalmente 0,002 a 13% en masa, preferentemente 0,01 a 5% en masa, más preferentemente 0,02 a 3% en masa, sobre la base de la composición total. Además, la cantidad de proteoglucano contenido en el material que contiene proteoglucano de la composición oral no está asimismo limitada; sin embargo, la cantidad es de generalmente 0,001 a 5% en masa, preferentemente 0,005 a 2% en masa, más preferentemente 0,01 a 1% en masa, sobre la base de la composición total.

40 Las composiciones cosméticas que contienen el material que contiene proteoglucano de la presente invención (puede hacerse referencia a continuación a estas composiciones cosméticas como composiciones cosméticas de la presente invención) utilizadas para los productos cosméticos pueden producirse combinando de manera adecuada el material que contiene proteoglucano de la presente invención con medios aceptables cosméticamente, bases, portadores, o aditivos; y, si resulta necesario, otros materiales y componentes aceptables cosméticamente mediante un procedimiento habitual. Más específicamente, los ejemplos de composiciones cosméticas incluyen emulsiones, lociones, cremas, sueros, bases, máscaras, y protectores solares, que se producen utilizando el material que contiene proteoglucano de la presente invención. Dichas composiciones cosméticas de la presente invención son utilizadas preferentemente para la prevención o el tratamiento de las quemaduras solares, hidratación y antienviejimiento de la piel (por ejemplo, la prevención o el tratamiento de la piel seca, la piel áspera, las arrugas faciales o piel flácida), y similares.

La cantidad de componente sacárido ácido contenido en el material que contiene proteoglucono de la composición cosmética de la presente invención no está particularmente limitada; sin embargo, la cantidad es de generalmente 0,002 a 5% en masa, preferentemente 0,02 a 2% en masa, más preferentemente 0,1 a 2% en masa, sobre la base de la composición total. Sin embargo, la cantidad de proteoglucono contenido en el material que contiene proteoglucono de las composiciones cosméticas no está asimismo limitada; sin embargo, la cantidad es de generalmente 0,001 a 2% en masa, preferentemente 0,01 a 1% en masa, más preferentemente 0,05 a 1% en masa, sobre la base de la composición total.

Las composiciones alimenticias y de bebida que contienen el material que contiene proteoglucono (puede hacerse referencia a continuación a estas composiciones alimenticias y de bebida como composiciones alimenticias y de bebida de la presente invención) utilizadas para los productos alimenticios y de bebida pueden producirse combinando adecuadamente el material que contiene proteoglucono de la presente invención con unas bases higiénicamente aceptables alimenticias, portadores, o aditivos; y, como resulte necesario, otros componentes o materiales utilizados para las bebidas y los alimentos. Sus ejemplos incluyen bebidas y alimentos elaborados con los efectos reivindicados de hidratación y antienvjecimiento de la piel (por ejemplo, prevención o tratamiento de la piel seca, la piel rugosa, las arrugas faciales o la piel flácida), alimento con reivindicaciones de salud (alimento con reivindicaciones de funciones nutrientes, alimento para utilizaciones de salud especificadas, etc.), suplementos, alimento de reducción de peso, alimento para pacientes, etc., que contienen el material que contiene proteoglucono de la presente invención. Además, la presente invención incluye asimismo hidratantes y agentes de antienvjecimiento de la piel formados por las composiciones de bebida y alimenticias mencionadas anteriormente de la presente invención. Los hidratantes y agentes de antienvjecimiento cutáneo pueden suministrarse en forma de bebidas, comprimidos, cápsulas, gránulos, gelatina, grageas, o similares para propósitos de antienvjecimiento de la piel o cosméticos (por ejemplo, la prevención o el tratamiento de la piel seca, la piel áspera, las arrugas faciales o la piel flácida).

La cantidad de componente sacárido ácido contenido en el material que contiene proteoglucono de las composiciones alimenticias y de bebida de la presente invención no está particularmente limitada; sin embargo en el caso de una composición alimenticia o un agente que comprenda una composición alimenticia, la cantidad es de generalmente 0,01 a 50% en masa, preferentemente 0,02 a 25% en masa, más preferentemente 0,1 a 8% en masa, sobre la base de la composición o agente total. La cantidad de componente sacárido ácido contenido en el material que contiene proteoglucono de una composición de bebida o un agente que comprenda una composición de bebida es de generalmente 0,002 a 13% en masa, preferentemente 0,01 a 8% en masa, más preferentemente 0,1 a 2% en masa, sobre la base de la composición o agente total. Además, la cantidad de proteoglucono contenido en el material que contiene proteoglucono de las composiciones alimenticias y de bebida no está asimismo limitada; sin embargo, en el caso de una composición alimenticia o un agente que comprenda una composición alimenticia, la cantidad es de generalmente 0,005 a 20% en masa, preferentemente 0,01 a 10% en masa, más preferentemente 0,05 a 3% en masa, sobre la base de la composición o agente total. En el caso de una composición de bebida o un agente que comprenda una composición de bebida, la cantidad es de generalmente 0,001 a 5% en masa, preferentemente 0,005 a 3% en masa, más preferentemente 0,01 a 1% en masa, sobre la base de la composición o agente total.

Además, el material que contiene proteoglucono de la presente invención es aplicado preferentemente en combinación con ácido hialurónico o colágeno. En una combinación con estas sustancias, el efecto del material que contiene proteoglucono de la presente invención aumenta. Por lo tanto, las composiciones orales, las composiciones cosméticas, las composiciones alimenticias y de bebida de la presente invención mencionadas anteriormente comprenden asimismo preferentemente un ácido hialurónico y/o colágeno (preferentemente colágeno hidrolizado). En particular, resulta preferida la administración oral del material que contiene proteoglucono de la presente invención junto con un ácido hialurónico, ya que mejora adicionalmente la hidratación de la piel y el efecto antienvjecimiento. La cantidad de ácido hialurónico no está limitada particularmente; sin embargo, es de 0,01 a 1 partes en masa, preferentemente 0,02 a 0,5 partes en masa, más preferentemente 0,05 a 0,2 partes en masa, por parte en masa del material que contiene proteoglucono de la presente invención.

La cantidad de componentes sacáridos ácidos contenidos en las composiciones orales, composiciones cosméticas, y composiciones alimenticias y de bebida de la presente invención puede descubrirse, por ejemplo, según el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico. Puede asimismo descubrirse la cantidad de componentes sacáridos ácidos mediante un cromatograma de detección de sacáridos ácidos obtenido mediante una cromatografía de filtración en gel de estas composiciones. Además, puede determinarse la cantidad de proteoglucono contenido en estas composiciones, por ejemplo, realizando una cromatografía de filtración en gel de cada composición, superponiendo el cromatograma de detección de sacárido ácido y el cromatograma de detección de proteínas, y detectando y determinando la cantidad de proteoglucono representada por un pico solapado.

La presente invención incluye asimismo un procedimiento para aplicar transdérmicamente u oralmente el material que contiene proteoglucono de la presente invención, obteniendo así los efectos mencionados en la presente memoria, es decir, el efecto de proliferación de fibroblastos, o el efecto de potenciación o mejora de la función de barrera de la piel. El procedimiento puede realizarse utilizando directamente el material que contiene proteoglucono de la presente invención, o más preferentemente utilizando las composiciones orales o las composiciones

cosméticas de la presente invención mencionadas anteriormente. El objeto del procedimiento no está limitado; sin embargo, resulta más preferido realizar el procedimiento en una persona que padece una reducción de la función de barrera de la piel debido al envejecimiento o las quemaduras solares. El procedimiento puede aplicarse asimismo para propósitos cosméticos. La cantidad de aplicación no está asimismo limitada, y puede aplicarse cualquier cantidad deseada.

Además, la presente invención incluye asimismo un procedimiento para la administración oral del material que contiene proteoglucano de la presente invención, obteniendo así los efectos mencionados en la presente memoria, es decir, el efecto de proliferación de los fibroblastos, el efecto de potenciación o mejora de la función de barrera de la piel, el efecto de la potenciación o mejora de la elasticidad cutánea, el efecto de la prevención del engrosamiento de la dermis, o el efecto de potenciación o mejora de la capacidad de la piel para producir colágeno. El procedimiento puede realizarse utilizando directamente el material que contiene proteoglucano de la presente invención, o más preferentemente utilizando las composiciones alimenticias o de bebida de la presente invención mencionadas anteriormente. El objeto del procedimiento no está limitado; sin embargo, resulta más preferido realizar el procedimiento en una persona que padece una reducción de la función de barrera de la piel, o una reducción de la elasticidad cutánea debida al envejecimiento o las quemaduras solares. El procedimiento puede aplicarse asimismo para propósitos cosméticos. La cantidad de aplicación no está asimismo limitada, y puede aplicarse cualquiera cantidad deseada.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describe con mayor detalle. Sin embargo, la presente invención no se encuentra limitada a los ejemplos siguientes.

Producción de materiales que contienen proteoglucano

Se sumerge una cabeza de salmón en agua, y se permite que permanezca durante un día para su hinchado. A continuación, el tejido diferente al cartílago nasal se elimina de la cabeza de salmón para obtener un cartílago nasal de salmón. El cartílago nasal de salmón se muele en polvo de cartílago nasal de salmón. Tras la adición de 100 ml de agua a 100 g de polvo y la agitación suave, se permite que la mezcla permanezca a temperatura ambiente durante 10 minutos, y desgrasada. Se realiza a continuación la centrifugación (8.000 rpm, 30 minutos, temperatura ambiente) y se recogió y liofilizó el residuo obtenido (polvo desgrasado de cartílago nasal de salmón). Utilizando un molino ultracentrífugo, se pulverizan 9,02 g del polvo desgrasado de cartílago nasal de salmón liofilizado en polvo fino con un tamaño de partícula de aproximadamente 100 a 200 μm (medido mediante un procedimiento de dispersión de difracción por láser). El polvo fino se lava con 20 ml de etanol tres veces, y a continuación es secado por aire para obtener 7,69 g de polvo fino que contiene componentes sacáridos ácidos. Se hace referencia a continuación a este polvo fino como "polvo de cartílago nasal salmón". Debe apreciarse que "lavar" con etanol en la presente memoria hace referencia a una operación (precipitación de etanol) en la que se dispersa el polvo fino en etanol, y a continuación se somete a centrifugación para recoger el precipitado.

Además, después de añadir 1.000 ml de agua purificada a temperatura ambiente (pH 6,5) a 20 g de polvo de cartílago nasal de salmón y de agitar durante 30 minutos, se permite que la mezcla permanezca a temperatura ambiente durante 10 minutos. A esto le sigue una centrifugación (8.000 rpm, 30 minutos, temperatura ambiente). Se recoge el sobrenadante y se seca mediante concentración para obtener aproximadamente 7 g de polvo que contiene componentes sacáridos ácidos. Se puede hacer referencia a continuación al extracto de agua obtenido así como "extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón".

El polvo de cartílago nasal de salmón contiene aproximadamente 20% en masa de componentes sacáridos ácidos y aproximadamente 9% en masa de proteoglucano (es decir, contiene en el mismo aproximadamente 11% en masa de sacárido ácido tal como glucosaminoglucano). Adicionalmente, el extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón contiene aproximadamente 35% en masa de componentes sacáridos ácidos y aproximadamente 15% en masa de proteoglucano (es decir, contiene en el mismo aproximadamente 20% en masa de sacárido ácido tal como glucosaminoglucano). Se calculan los porcentajes sobre la base de que el ácido urónico (ácido glucurónico) se cuantifica mediante el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico; además, se determina la cantidad (masa) de sulfato de condroitina utilizando la fórmula bien conocida en este procedimiento de cuantificación, y la cantidad de sulfato de condroitina se define como la cantidad de componentes sacáridos ácidos.

[Fórmula 1]

La cantidad de sulfato de condroitina = la cantidad de ácido glucurónico x 2,593

A continuación, si no se especifica otra cosa, la cantidad de componentes sacáridos ácidos determinada mediante el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico indica la cantidad de sulfato de condroitina determinada de la misma manera que anteriormente.

Además, puede calcularse el contenido de proteoglucano a partir de la proporción de área del área pico que

representa el proteoglucano en un cromatograma para el área completa del cromatograma. El cromatograma se obtiene como se describe anteriormente, realizando un análisis de cromatografía de filtración en gel mientras se monitoriza la cantidad de componentes sacáridos ácidos cuantificando el ácido urónico. Específicamente, el contenido de proteoglucano puede calcularse multiplicando la proporción de área por la cantidad de componentes sacáridos ácidos.

Análisis del peso molecular de los materiales que contienen proteoglucano

Se analiza el peso molecular de los materiales que contienen proteoglucano mediante cromatografía de filtración en gel. Más específicamente, el polvo de cartílago nasal de salmón y un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón, utilizados como muestras, se someten a una cromatografía de filtración en gel bajo las condiciones siguientes; y se recogen fracciones eluidas de 1 ml para cuantificar las cantidades de sacárido ácido y proteína contenidas en cada una de las fracciones mediante el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico y el procedimiento de absorción de UV, respectivamente.

La figura 2 representa los cromatogramas obtenidos como resultado del análisis de cromatografía de filtración en gel. Debe apreciarse que los cromatogramas que analizan la cantidad de sacárido ácido representan la cantidad de ácido glucurónico cuantificada mediante el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico (no la cantidad de sulfato de condroitina determinada multiplicando la cantidad de ácido glucurónico por 2,593). Respecto al polvo de cartílago nasal de salmón, se realiza la extracción con clorhidrato de guanidina 4 M (4 M GuCl) para aumentar la pureza, y se utiliza el extracto resultante como una muestra. Se realiza específicamente la extracción como se expone a continuación. Se añade GuCl 4 M a 1 g del polvo de cartílago nasal de salmón y se agita a 4°C durante un día, seguido de centrifugación. Una cantidad de tres veces de etanol saturado con cloruro sódico se añade al sobrenadante, y se deja que permanezca durante la noche. A continuación, se realiza una centrifugación para recoger el precipitado. Este precipitado se utiliza como una muestra para la cromatografía de filtración en gel. El extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón se utiliza como una muestra.

[Condiciones de la cromatografía de filtración en gel]

Columna: columna de relleno Sepharose CL-2B (ϕ1 cm x 48 cm columna de relleno con Sepharose CL-2B como soporte; Sepharose CL-2B presenta un intervalo de fraccionamiento de dextrano de 100 a 20.000 kDa, y resulta disponible en, por ejemplo, GE Healthcare; Sepharose CL-2B, CAS registro nº 65099-79-8, es una agarosa reticulada al 2% con un tamaño de partícula de 60 a 200 µm (medido mediante un procedimiento de dispersión de difracción por láser))

Amortiguador: Amortiguador de fosfato de 0,1 M (pH 7,1, que contiene NaCl de 0,2 M)
 Cantidad de la muestra aplicada: 4 mg (disueltos en 1 ml de amortiguador para su utilización)
 Caudal: 0,15 ml/min
 Cantidad de fracción: 1 ml/tubo

Además, se someten el proteoglucano disponible comercialmente (al que se hace referencia en adelante en ocasiones como "PG-K") y el glucosaminoglucano disponible comercialmente (condroitina) (al que se hace referencia en adelante en ocasiones como "PG-M") a cromatografía de filtración en gel bajo las mismas condiciones, y se cuantifica la cantidad de sacárido ácido contenida en cada fracción eluida. La figura 3 representa los resultados.

Como se representa en la figura 2, para una cantidad de eluido en el intervalo de aproximadamente 15 a 23 ml, se aprecia un pico para el sacárido y la proteína. Por lo tanto, se descubre que este pico representa el proteoglucano.

A continuación, cada uno de los diversos marcadores de peso molecular de dextrano descritos anteriormente se somete asimismo a cromatografía de filtración en gel bajo las mismas condiciones descritas anteriormente (con la excepción de que la cantidad de la muestra es de 1 mg), y se cuantifica la cantidad de sacárido (es decir, cantidad de dextrano) contenido en cada fracción de eluido mediante el procedimiento fenol-ácido sulfúrico. Más específicamente, la cantidad de sacárido se cuantifica como se expone a continuación, según el procedimiento descrito en Hodge, J.E. y Hofreiter, B.T., Methods in Carbohydrate Chemistry, 1, 338 (1962).

[1] Se disponen 500 µl de una disolución acuosa de muestra o una disolución acuosa de monosacárido estándar (manosa) en un tubo de ensayo de 105 x 15 mm.

[2] Se le añaden 500 µl de un reactivo de fenol (5% en v/v de disolución de fenol acuosa) y se agita.

[3] Se le añaden 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, y se agita enérgicamente inmediatamente durante 10 segundos.

[4] Se deja que la mezcla permanezca durante 20 minutos o más a temperatura ambiente.

[5] Se mide la absorción a 490 nm con un espectrofotómetro.

<Marcadores de peso molecular de dextrano>

Dextrano a partir de *Leuconostoc mesenteroides* (peso mol 5.000.000-40.000.000) (Sigma-Aldrich Co.) para medir el volumen de vacío, 10.000 kDa

Dextrano estándar 1.400.000 (Sigma-Aldrich Co.) 1.400 kDa

Dextrano estándar 670.000 (Sigma-Aldrich Co.) 670 kDa

Dextrano estándar 410.000 (Sigma-Aldrich Co.) 410 kDa

Dextrano estándar 270.000 (Sigma-Aldrich Co.) 270 kDa

Se utiliza el marcador de dextrano a partir de *Leuconostoc mesenteroides* para medir el volumen de vacío de la columna de relleno de Sepharose CL-2B (límite superior de fraccionamiento: 20.000 kDa). Para medir con mayor exactitud el volumen de vacío, se realiza un pretratamiento para eliminar el dextrano de peso molecular bajo contenido en el marcador. Se realiza el pretratamiento para eluir el dextrano a partir de *Leuconostoc mesenteroides* bajo las condiciones descritas anteriormente en "condiciones de la cromatografía de filtración en gel", y recoger y liofilizar las fracciones que presentan un peso molecular de 20.000 kDa o superior. Más específicamente, las fracciones que consisten en la cantidad de eluido de 15 a 19 ml, que corresponden a un primer pico aparecido, se recogen y liofilizan (se cree que el dextrano que presenta un peso molecular de 20.000 kDa o superior se obtiene recogiendo y liofilizando dichas fracciones). A continuación, este producto liofilizado se aplica a la columna, y es medido.

Los cromatogramas resultantes son representados en las figuras 4A a 4E. La figura 4A representa las mediciones del producto liofilizado pretratado mencionado anteriormente. Debido a que el peso molecular del producto pretratado de dextrano a partir de *Leuconostoc mesenteroides* en la figura 4A supera el intervalo de fraccionamiento (100 kDa a 20.000 kDa) de la columna de relleno de Sepharose CL-2B utilizada, la cantidad de eluido correspondiente a la posición superior de pico se define como la cantidad de eluido a la que las moléculas de 20.000 kDa, que es el límite de exclusión de la columna, son eluidas. Esta cantidad de eluido se interpreta como indicativa del volumen de vacío de la columna. En cada una de las figuras 4B a 4E, el cantidad de eluido correspondiente a la posición de la bisectriz de cada área de pico en el cromatograma designa la cantidad de eluido a la que las moléculas del peso molecular del marcador son eluidas. Las figuras 4B a 4E representan respectivamente los resultados de las mediciones de Dextrano estándar 1.400.000, 670.000, 410.000 y 270.000. Se representa en un gráfico la relación entre estas cantidades de eluido y los pesos moleculares, y se obtiene una curva de calibración lineal ($y = -4,1355\ln(x) + 59,47$; $R^2 = 0,9869$) (figura 5). A partir de esto, se confirma que los pesos moleculares y las cantidades de eluido obtenidas mediante los marcadores de peso molecular de dextrano correlacionan en gran medida.

Además, se descubre a partir de los resultados del análisis que existe una posibilidad elevada de que antes de alcanzar el volumen de vacío un eluido contenga proteoglicano (es decir, un proteoglicano superior a 20.000 kDa, límite de fraccionamiento, existe). Dado que el intervalo de fraccionamiento de la columna utilizada en la cromatografía de filtración en gel es de 100 kDa a 20.000 kDa, resulta muy posible que no se fraccionaran de manera precisa las moléculas de 20.000 kDa o más. Por lo tanto, como anteriormente, se realiza asimismo la cromatografía de filtración en gel bajo las condiciones siguientes utilizando polvo de cartílago nasal de salmón como muestra, y se cuantifica la cantidad de sacárido ácido en cada fracción.

[Condiciones de la cromatografía de filtración en gel]

Columna: columna de relleno de Sephacryl S-1000 SF (ϕ 1 cm x 48 cm columna de relleno con Sephacryl S-1000 SF como soporte; el Sephacryl S-1000 SF presenta un intervalo de fraccionamiento de dextrano de 5×10^5 a 1×10^8 Da, y resulta disponible en, por ejemplo, GE Healthcare)

Amortiguador: amortiguador de fosfato 0,1 M (pH de 7,1, que contiene NaCl 0,2 M)

Cantidad de la muestra aplicada: 4 mg

Caudal: 0,3 ml/min

Cantidad de fracción: 1 ml/tubo

Además, se somete a los marcadores de peso molecular descritos anteriormente a una cromatografía de filtración en gel bajo las mismas condiciones. Se cuantifica la cantidad de sacárido (es decir, cantidad de dextrano) contenido en cada fracción eluida mediante el procedimiento fenol-ácido sulfúrico, y se prepara la curva de calibración.

<Marcadores de peso molecular de dextrano>

Dextrano a partir de *Leuconostoc mesenteroides* (peso mol 5.000.000-40.000.000) (Sigma-Aldrich Co.) 10.000 kDa

Dextrano estándar 1.400.000 (Sigma-Aldrich Co.) 1.400 kDa

Dextrano estándar 670.000 (Sigma-Aldrich Co.) 670 kDa

La curva de calibración obtenida es como se expone a continuación:

5 $y = -3,8743 \ln(x) + 59,887$ ($R^2=0,9961$)

La figura 6 es un gráfico que representa en conjunto los gráficos de los resultados de la medición de las cantidades de sacárido ácido ilustradas en las figuras 2 y 3, y que representa además la relación entre los pesos moleculares y las cantidades de eluido obtenidas como se describe anteriormente. Como se ha mencionado anteriormente, respecto al polvo de cartílago nasal de salmón y al extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón, aparece un pico en una cantidad del eluido en el intervalo de aproximadamente 15 a 23 ml en el análisis de cromatografía de filtración en gel. Por otro lado, aparece un pico en el intervalo de aproximadamente 28 a 49 ml para el proteoglucono PG-M disponible comercialmente, y en el intervalo de aproximadamente 18 a 47 ml para el PG-K disponible comercialmente. Esto muestra que el polvo de cartílago nasal de salmón y el extracto de agua del polvo de cartílago nasal de salmón (es decir, los materiales que contienen proteoglucono de la presente invención) contienen un proteoglucono de un peso molecular muy elevado que es diferente del proteoglucono conocido hasta el momento.

Además, a partir de la curva de calibración representada en la figura 5 puede calcularse que una cantidad de eluido de 23 ml corresponde a un peso molecular de aproximadamente 6.700 kDa. Así, se descubre que el polvo de cartílago nasal de salmón y el extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón contienen proteoglucono de un peso molecular de aproximadamente 6.000 kDa o superior.

Además, la figura 7 representa los resultados del análisis del polvo de cartílago nasal de salmón que utiliza la columna de relleno de Sephacryl S-100 0SF. En la figura 7, el aumento del pico de proteoglucono a partir de su primera aparición en el cromatograma parte de una cantidad de eluido en el intervalo de 15 a 16 ml. El peso molecular correspondiente a este intervalo de cantidad de eluido se calcula utilizando la curva de calibración mencionada anteriormente ($y = -3,8743 \ln(x) + 59,887$), y se determina que es de aproximadamente 90.000 kDa. Por lo tanto, se descubre que el polvo de cartílago nasal del salmón contiene proteoglucono de aproximadamente 90.000 kDa.

A partir de lo expuesto anteriormente, se confirma que el polvo de cartílago nasal del salmón contiene proteoglucono de aproximadamente 6.000 a 90.000 kDa.

Además, utilizando la curva de calibración representada en la figura 5, se calcula el peso molecular medio de proteoglucono en cada muestra a partir de la cantidad de eluido en la posición de pico en cada gráfico correspondiente en la figura 6. El peso molecular medio es calculado comúnmente a partir de la cantidad de eluido en la posición de la bisectriz de un área de pico. Sin embargo, dado que el pico de proteoglucono en cada cromatograma representado en la figura 6 es de una forma prácticamente simétrica, se define la posición de pico como una posición de bisectriz, y se calcula el peso molecular medio. Más específicamente, considerando el error experimental y la diferencia de lote, se consideran los valores comprendidos en ± 1 ml de la cantidad de eluido en la posición de pico como valores y de la curva de calibración, y se considera el intervalo de los valores x obtenidos como el peso molecular medio de proteoglucono en cada muestra. Sin embargo, dado que el límite superior del intervalo de fraccionamiento de la columna utilizada (columna de relleno de Sepharose CL-2B) es de 20.000 kDa, existe la posibilidad de que el límite superior del peso molecular medio de proteoglucono obtenido a partir del análisis no sea calculado de manera precisa. Por lo tanto, de manera similar, se determina asimismo el peso molecular medio de proteoglucono a partir de los resultados obtenidos cuando es utilizada la columna de relleno Sephacryl S-1000. Los resultados se representan en la tabla 1.

[Tabla 1]

	Peso molecular medio de proteoglucono contenido (columna de relleno de Sepharose CL-2B)	Peso molecular medio de proteoglucono contenido (columna de relleno de Sephacryl S-1000 SF)
Polvo de cartílago nasal de salmón	12.200 kDa a 19.500 kDa	22.000 kDa a 38.000 kDa
Extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón	9.700 kDa a 15.500 kDa	
PG-K	480 kDa a 760 kDa	
PG-M	90 kDa a 150 kDa (condroitina)	

Se descubre a partir de los resultados anteriores que el peso molecular medio de proteoglucono contenido en los materiales que contienen proteoglucono de la presente invención es de aproximadamente 9.700 kDa a 38.000 kDa.

Además, con relación al polvo de cartílago nasal de salmón y al extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón, se determina la cantidad de eluido correspondiente a la posición en la que el área del cromatograma

obtenido mediante el análisis con la columna de relleno de Sepharose CL-2B biseca (flechas de puntos en la figura 6), y se obtiene el peso molecular medio a partir de los valores comprendidos en ± 1 ml de la cantidad determinada de eluido. Como resultado, el peso molecular medio de la mezcla de componentes sacáridos ácidos en el polvo de cartílago nasal de salmón es de aproximadamente 4.800 kDa a 7.700 kDa, y el peso molecular medio de la mezcla de componentes sacáridos ácidos en el extracto de agua del polvo de cartílago nasal de salmón es de aproximadamente 1.800 kDa a 4.200 kDa.

Además, con relación al polvo de cartílago nasal de salmón, se determina la cantidad de eluido correspondiente a la posición en la que el área del cromatograma obtenido mediante el análisis con la columna de relleno de Sephacryl S-1000 SF bisecta (flecha de puntos en la figura 7), y el peso molecular se obtiene a partir de los valores comprendidos en ± 1 ml de la cantidad determinada de eluido. Como resultado, el peso molecular medio de los componente sacáridos ácidos contenidos en el polvo de cartílago nasal de salmón es de aproximadamente 3.900 kDa a 6.600 kDa.

Análisis del efecto antienvjecimiento de la piel de los materiales que contienen proteoglucano

Evaluación de la capacidad para promover la proliferación celular

Se utilizan el polvo de cartílago nasal de salmón, un extracto de agua del polvo de cartílago nasal de salmón, y PG-K como muestras, se analizan sus efectos de proliferación celular. Más específicamente, se realiza el experimento siguiente. Se siembran en una placa de cultivo fibroblastos cutáneos humanos (HDF50: Cell Applications, Inc.) a $1,0 \times 10^4$ células en un medio esencial mínimo (MEM) que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS). Se añade cada muestra individualmente al MEM a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ o 10 $\mu\text{g/ml}$. Adicionalmente, se utiliza un medio al que no se añade nada como control. Tras la adición, las células se cultivan durante cinco días. Tras el cultivo, se extrae el MEM y se separan y suspenden las células con tripsina-EDTA (Invitrogen). A continuación, se añade tinción azul tripano (Sigma-Aldrich Co.) y se cuenta el número de células utilizando una cámara de recuento Burker-Turk.

La figura 8 representa los resultados. Se descubre a partir de los resultados que el polvo de cartílago nasal de salmón y el extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón presentan una capacidad significativa para hacer proliferar los fibroblastos cutáneos humanos, mientras que el PG-K, un proteoglucano disponible comercialmente, no presenta la capacidad de proliferación.

Además, como se representa en la figura 6, existe una gran diferencia en los pesos moleculares de los componentes contenidos de PG-K, y el polvo de cartílago nasal de salmón y el extracto de agua del polvo de cartílago nasal de salmón. En particular, en el cromatograma para PG-K, no se aprecia un pico para el proteoglucano de peso molecular elevado, que existe en los cromatogramas para el polvo de cartílago nasal de salmón y el extracto de agua del polvo de cartílago nasal de salmón. Por lo tanto, parece que la capacidad mencionada anteriormente para hacer proliferar los fibroblastos cutáneos humanos se atribuye al proteoglucano de peso molecular elevado.

Evaluación de la capacidad de hidratación y antienvjecimiento de la piel mediante la ingestión

<Animal experimental utilizado>

Se utilizan ratones sin pelo (Hr/Kud ♂) para un experimento. Son alimentados preliminarmente los ratones macho (de cuatro semanas) que se encuentran libres de la influencia de fluctuaciones de estrógeno sobre las condiciones cutáneas, y se utilizan a continuación para el experimento.

<Método de ensayo>

Se disponen los ratones en cinco jaulas de alimentación, como se representa en la tabla 2 (seis ratones para un grupo). Además, se marcan los ratones sobre su parte de la cola para su identificación individual. Se prolonga su alimentación preliminar hasta que alcanzan las siete semanas.

<Tabla 2>

Grupo	Abreviatura	Material de evaluación	Radiación UVB
1	Co-UVB	Agua (control)	Sin
2	Co+UVB	Agua (control)	Con
3	HA+UVB	Ácido hialurónico	Con
4	PG+UVB	Material que contiene proteoglucano	Con
5	PG/HA+UVB	Material que contiene proteoglucano + ácido hialurónico	Con

<Preparación de las muestras de administración oral de los materiales de evaluación>

5 Se prepara 2% de dispersión de polvo de cartílago nasal de salmón y se realiza una centrifugación. Se utiliza el sobrenadante como una muestra de administración del material que contiene proteoglicano. Este sobrenadante corresponde a un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón disuelto en agua. El sobrenadante se evapora hasta la sequedad para proporcionar unos sólidos. El sobrenadante contiene aproximadamente 0,7% en masa del extracto de agua del polvo de cartílago nasal de salmón. Además, se cuantifica la cantidad de componentes sacáridos ácidos contenidos en el sobrenadante mediante el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico. La cantidad de componentes sacáridos ácidos es de aproximadamente 0,17% en masa respecto al sobrenadante. Además, el análisis de cromatografía de filtración en gel se realiza para determinar la cantidad de proteoglicano contenido en el sobrenadante a partir de una proporción de área del cromatograma obtenido. La cantidad de proteoglicano es de aproximadamente 0,7% en masa respecto al sobrenadante.

15 Se preparan 0,5% en masa de disolución acuosa de ácido hialurónico y se utilizan como una muestra de administración de ácido hialurónico. Adicionalmente, una mezcla de líquido 1:1 (proporción de masa) de la muestra de administración del material que contiene proteoglicano y la muestra de administración de ácido hialurónico se utiliza como una muestra de administración para la coadministración de proteoglicano y ácido hialurónico. Para los controles, se administra agua destilada. Debe apreciarse que se utiliza el ácido hialurónico adquirido en Nakahara, Co., Ltd.

<Procedimiento de administración oral>

25 Cuando los ratones sin pelo alcanzan las siete semanas, se proporcionan individualmente una vez diaria 0,5 ml de cada muestra de administración mediante administración oral forzada utilizando una sonda. Se prolonga esta administración a una frecuencia de cinco veces a la semana (lunes a viernes) hasta el final del experimento.

30 Las cantidades de los materiales de evaluación contenidos en cada una de las muestras de administración son como se expone a continuación.

Ácido hialurónico: 2,5 mg/día

35 Material que contiene proteoglicano: aproximadamente 3,5 mg/día (componentes sacáridos ácidos: aproximadamente 0,83 mg/día, proteoglicano: aproximadamente 0,33 mg/día).

40 Material que contiene proteoglicano + ácido hialurónico: aproximadamente 1,75 mg/día de material que contiene proteoglicano (componentes sacáridos ácidos: aproximadamente 0,42 mg/día, proteoglicano: aproximadamente 0,17 mg/día), y 1,25 mg/día de ácido hialurónico.

<Procedimiento de radiación UVB>

45 Se inicia la radiación UVB a partir de las cuatro semanas tras el inicio de la administración oral. Se disponen los ratones en una jaula para la radiación UVB. La jaula se dispone en el interior de un dispositivo de radiación UVB para realizar la radiación UVB cinco veces semanalmente (lunes a viernes), a una intensidad de 1,0 mW/cm². La cantidad de radiación es de 60 mJ/cm² durante únicamente la primera semana tras el inicio de la radiación, y de 120 mJ/cm² desde la segunda semana en adelante. La cantidad total de radiación UVB durante el periodo de la semana 10 es de 5,7 J/cm². Debe apreciarse que los UVB son rayos ultravioleta con longitudes de onda de 280 a 315.

<Evaluación de las funciones de barrera de la piel>

55 Utilizando un medidor de agua transepidérmica ("tewameter"), un instrumento de medición de la piel de tipo multisonda (MPA580: Courage-Khazaka), se mide la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) con una frecuencia de una vez semanalmente para evaluar las funciones de barrera de la piel. Se miden las tres zonas sobre el lomo de cada ratón, y se calcula el valor medio. Se indica que cuanto mayor valor de TEWL, menores funciones de barrera de la piel (funciones que evitan el acceso de materias extrañas desde el exterior de la piel hacia el cuerpo, y que evitan la fuga de humedad desde el interior del cuerpo hacia el exterior).

60 La figura 9 representa los resultados de la medición de la TEWL ocho semanas tras el inicio de la radiación UVB. Además, la tabla 3 representa los valores relativos de TEWL de los grupos de ratones 3 a 5 cuatro semanas, seis semanas y ocho semanas tras el inicio de la radiación UVB, con respecto al valor de TEWL de un control sin irradiar (grupo 1: Co-UVB), que se asume es 100; y el valor de TEWL de un control irradiado con UVB (grupo 2: Co+UVB), que se asume es 0. Los valores relativos puede decirse que indican una tasa de mejora de la barrera de la piel (%).

[Tabla 3]

<Radiación UVB>

	4 semanas	6 semanas	8 semanas
HA+UVB	-15	-5	-17
PG+UVB	5,2	3,7	34
PG/HA+UVB	36	35	30

5

Se descubre a partir de estos resultados que el material que contiene proteoglicano de cartílago nasal de salmón reduce el valor de TEWL y mejora las funciones de barrera de la piel mediante la administración oral (figura 9 y tabla 3). Además, se descubre que la ingestión del material que contiene proteoglicano del cartílago nasal de salmón en combinación con el ácido hialurónico garantiza el efecto de mejora de las funciones de barrera de la piel en un estadio más temprano (tabla 3).

10

<Evaluación de la elasticidad de la piel>

Se mide la elasticidad de la piel con un cutómetro, un instrumento de medición de la piel de tipo multisonda (MPA580: Courage-Khazaka). Más específicamente, se miden cuatro zonas sobre el lomo de cada ratón, y se calcula la elasticidad (valor R2) mediante la fórmula siguiente utilizando el valor Uf y el valor Ua obtenidos. Debe apreciarse que el valor Ua representa el regreso de la piel tras la liberación de la aspiración, y el valor Uf representa la extensibilidad de la piel al aspirar.

15

$$\text{Elasticidad (R2)} = Ua/Uf$$

20

La figura 10 representa los resultados del análisis realizado ocho semanas tras el inicio de la radiación UVB (en la figura 10, UVB se escribe como UV). Se sugiere a partir de los resultados que el material que contiene proteoglicano de cartílago nasal de salmón presenta un efecto de mejora de la elasticidad de la piel mediante la administración oral. Además, se representa que la ingestión del material que contiene proteoglicano de cartílago nasal de salmón en combinación con ácido hialurónico restablece la elasticidad de la piel.

25

<Evaluación de la capacidad para producir colágeno>

Diez semanas tras el inicio de la radiación UVB, se recoge el tejido cutáneo sobre el lomo de cada ratón. Se somete una parte del tejido cutáneo del lomo a fijación en formalina (para preparar secciones tisulares cutáneas), y se utiliza el resto para cuantificar el colágeno.

30

El tejido cutáneo así obtenido (para cuantificar el colágeno) es congelado y pulverizado en polvo con un pulverizador celular (automolino, TK-AM5) (Tokken), y el polvo es secado con una secadora de vacío. Se disuelven los comprimidos de cóctel (Complete Mini Easy Pack (Roche)) de inhibidor de proteasa (P.I.) en ácido acético de 0,5 M. Este ácido acético (que contiene P.I.) se añade al polvo tisular cutáneo anterior, y se agita a una temperatura baja. Es seguido por una centrifugación, y se recoge la parte de sobrenadante (extracto de colágeno soluble en ácido).

35

A continuación, se mide la cantidad de colágeno del extracto de colágeno soluble en ácido utilizando un kit para cuantificar el colágeno soluble en ácido (Sicol Soluble Collagen Assay (Biocolor)) basándose en el manual.

40

La figura 11 representa los resultados. Se descubre a partir de los resultados que el material que contiene proteoglicano a partir de cartílago nasal de salmón mejora significativamente la reducción de la capacidad para producir colágeno en la piel mediante la administración oral.

45

<Análisis del efecto de inhibición del engrosamiento de la dermis>

Utilizando las secciones tisulares fijadas en formalina mencionadas anteriormente, se preparan bloques incorporados en parafina con un dispositivo de fijación de parafina automático (procesador de tejido (Tissue-Tek)). Se realizan las secciones con un microtomo, con tinción de hematoxilina-eosina (HE), y utilizadas como muestras.

50

Se observan las muestras con un microscopio óptico, y se almacenan las imágenes en una cámara digital. En cada una de las imágenes obtenidas, se mide el grosor de la capa dérmica en 10 ubicaciones. El promedio de los valores de medición se calcula como el grosor de la capa dérmica. La figura 12 representa los resultados (en la figura 12, UVB es escrito como UV). Se descubre a partir de los resultados que el material que contiene proteoglicano a partir de cartílago nasal de salmón inhibe significativamente el engrosamiento de la dermis mediante la administración oral. Además, se muestra que la ingestión del material que contiene proteoglicano a partir de cartílago nasal de salmón en combinación con el ácido hialurónico permite la inhibición significativa del engrosamiento de la dermis, y que la capacidad de inhibición es superior a la de los casos en los que es tomado únicamente el material que contiene proteoglicano a partir de cartílago nasal de salmón.

55

60

Evaluación de la capacidad de hidratación y antienvjecimiento de la piel mediante la aplicación en la piel<Animal experimental utilizado>

5 Son utilizados ratones sin pelo (Hr-/Kud ♂) (Kyudo Co. Ltd.) para un experimento. Son alimentados preliminarmente unos ratones macho (de cuatro semanas) que se encuentran libres de la influencia de fluctuaciones de estrógeno sobre las condiciones de la piel, y a continuación son utilizados para el experimento.

<Método de ensayo>

10 Se disponen los ratones en cuatro jaulas de alimentación, como se representa en la figura 4 (cinco ratones para un grupo). Además, los participantes son marcados sobre su parte de la cola para su identificación individual. Se prolonga su alimentación preliminar hasta que alcanzan las siete semanas.

15 [Tabla 4]

Grupo	Abreviatura	Material de evaluación (muestra de aplicación)	Radiación UVB
1	Co-UVB	disolución acuosa de goma xantana al 0,5% (control)	sin
2	Co+UVB	disolución acuosa de goma xantana al 0,5% (control)	con
3	HA+UVB	disolución acuosa de ácido hialurónico al 0,5%	con
4	PG+UVB	disolución acuosa de polvo de cartílago nasal de salmón	con

<Evaluación de las funciones de barrera de la piel>

20 Cuando los ratones sin pelo alcanzan las siete semanas, se aplican 0,1 ml de una muestra de aplicación respectiva al lomo de los ratones una vez diariamente, y se someten los ratones sin pelo a una radiación UVB de la misma manera descrita en la sección "Evaluación de la capacidad de hidratación y antienvjecimiento de la piel mediante la ingestión" anterior. Tras cinco semanas del inicio de la radiación UVB, se mide la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) de la misma manera descrita en la sección mencionada anteriormente "Evaluación de la capacidad de hidratación y antienvjecimiento de la piel mediante la ingestión". La figura 13 representa los resultados (en la figura 13, UVB es escrito como UV). Se descubre a partir de los resultados que el material que contiene proteoglicano a partir de cartílago nasal de salmón reduce significativamente el valor de TEWL, y mejora las funciones de barrera de la piel mediante la aplicación en la piel.

30 Como se describe anteriormente, parece que la capacidad para la proliferación de fibroblastos humanos se atribuye al proteoglicano de peso molecular alto, que no está contenido en PG-K. Así, parece que otros efectos diversos son atribuidos asimismo al proteoglicano.

<Fraccionamiento del extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón y verificación del efecto>

40 Se fracciona un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón utilizando una cromatografía de intercambio iónico y una cromatografía de filtración en gel para analizar qué fracción presenta un efecto de proliferación celular. La figura 14 representa un procedimiento de fraccionamiento. Las condiciones de fraccionamiento son las siguientes.

<Cromatografía de intercambio iónico>

45 Se rellena una columna de $\phi 5,0$ cm x 20 cm con un soporte (DEAE Sephacel (GE Healthcare)) hasta una altura de 15 cm. Debe apreciarse que DEAE es una abreviatura de dietilaminoetilo.

50 Como un disolvente, se utiliza un amortiguador de tris-ácido clorhídrico 50 mM-urea 7 M (pH 7,4). Utilizando un disolvente en el que se añade cloruro sódico de 0 a 0,75 M al disolvente anterior, se realiza la elución mediante una elución por gradiente (gradiente lineal). Se disuelven aproximadamente 100 mg de un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón en aproximadamente 20 ml del disolvente. A continuación, se realiza una operación según la página 189 de Kiso Seikagaku Jikkenho (*Basic Biochemistry Experimental Method*), vol. 5 (Shishitsu/Toshitsu/Fukugo Toshitsu (*Lipids/Carbohydrates/Complex Carbohydrates*)) editado por la Japanese Biochemichal Society (Tokyo Kagaku Dojin); y se fracciona el extracto de agua del polvo de cartílago nasal de salmón en una fracción de proteína, una fracción de ácido hialurónico, y una fracción de sacárido ácido con grupos sulfato. Se realiza la elución de la columna a un caudal de 2,0 ml/min, y el volumen de cada una de las fracciones individuales en las fracciones combinadas siguientes es de 16 ml. En este caso, la fracción de proteína es una fracción combinada de fracción números 16 a 35; la fracción de ácido hialurónico es una fracción combinada de fracción números 37 a 42; y la fracción de sacárido ácido con grupos sulfato es una fracción combinada de fracción números 52 a 67. Aunque el ácido hialurónico es asimismo un tipo de sacárido ácido, no presenta grupos sulfato. El sacárido ácido (por ejemplo, sulfato de condroitina) contenido en el proteoglicano presenta grupos sulfato. Adicionalmente, dado que la polaridad molecular aumenta en orden de proteína (en particular, colágeno), ácido

hialurónico, y sacárido ácido que presenta grupos sulfato, estas tres sustancias pueden fraccionarse mediante cromatografía de intercambio iónico.

5 Se cuantifica la proteína mediante medición de absorbancia a 280 nm. Se cuantifica el ácido hialurónico utilizando un kit Seikagaku Co. para cuantificar el ácido hialurónico. Se cuantifica el sacárido ácido que presenta grupos sulfato mediante el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico.

10 Las cantidades de proteína, ácido hialurónico y sacárido ácido que presenta grupos sulfato que corresponden al caso en el que se aíslan 100 mg del extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón son de 0,9 mg, 1,2 mg y 43,0 mg, respectivamente.

15 Se utilizan cuatro muestras de la fracción de proteína, la fracción de ácido hialurónico, la fracción de sacárido ácido con grupos sulfatos así obtenidas, y un extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón, y se analiza la capacidad de proliferación de los fibroblastos de piel humana de cada muestra de la misma manera que en la sección "Evaluación de la capacidad para promover la proliferación celular" anterior. La figura 15 representa los resultados. Aparte del extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón, únicamente la fracción de sacárido ácido con grupos sulfato presenta una capacidad significativamente elevada para la proliferación de fibroblastos de la piel humanos con respecto al grupo control. Además, la fracción de sacárido ácido con grupos sulfato presenta una capacidad elevada para la proliferación de fibroblastos de la piel humanos, incluso en comparación con el extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón. Por lo tanto, parece que el efecto de proliferación de los fibroblastos de la piel humanos del extracto de agua de polvo de cartílago nasal de salmón se atribuye al sacárido ácido que presenta grupos sulfato. Además, parece que este efecto se atribuye al proteoglicano, debido al hecho de que la fracción de sacárido ácido con grupos sulfato es rica en proteoglicano.

25 En las figuras 14 a 16, la fracción de sacárido ácido con grupos sulfato se escribe simplemente como "fracción de sacárido ácido".

<Cromatografía de filtración en gel>

30 Se fraccionan adicionalmente 43,0 mg de la fracción de sacárido ácido con grupos sulfato obtenida como se describe anteriormente mediante cromatografía de filtración en gel. Más específicamente, bajo las condiciones de cromatografía de filtración en gel que utilizan una columna de relleno Sepharose CL-2B como se describe en la sección "Análisis del peso molecular de los materiales que contienen proteoglicano" anterior, se añade 1 ml de amortiguador por 5 mg de la fracción de sacárido ácido con grupos sulfato, y se disuelve para fraccionar la fracción de sacárido ácido con grupos sulfato en una fracción que presenta un peso molecular de 5.000 kDa o superior, y una fracción que presenta un peso molecular inferior a 5.000 kDa. La cantidad de sacárido ácido contenido en cada fracción se cuantifica mediante el procedimiento de carbazol-ácido sulfúrico. La fracción que presenta un peso molecular de 5.000 kDa contiene 9,7 mg de sacárido ácido, y la fracción que presenta un peso molecular inferior a 5.000 kDa contiene 16,8 mg de sacárido ácido.

40 La figura 16 representa los resultados en los que el efecto de la proliferación de los fibroblastos de la piel humanos de estas fracciones es analizado de la misma manera que anteriormente. Se muestra que la fracción que presenta un peso molecular de 5.000 kDa o superior presenta un efecto elevado de la proliferación de fibroblastos de la piel humanos, en comparación con la fracción que presenta un peso molecular inferior a 5.000 kDa. A partir de los resultados, parece que el efecto es principalmente atribuible al proteoglicano. Particularmente, parece que el proteoglicano de peso molecular elevado (peso molecular de 5.000 kDa o superior) contribuye al efecto.

50 Debe apreciarse que los significados de los signos "+," "★★," "★★★" en las figuras 15 y 16 son los mismos que los de la figura 8.

55 Los ejemplos de formulación de las composiciones orales, las composiciones cosméticas, y composiciones alimenticias o de bebida según la presente invención se describen a continuación. Debe apreciarse que % indica % en masa. Los ejemplos de formulación 1 a 7, son para las composiciones cosméticas; los ejemplos de formulación 8 a 16 son para las composiciones alimenticias o de bebida; y los ejemplos de formulación 17 a 22 son para las composiciones orales.

Los procedimientos para producir materiales que contienen proteoglicano utilizados en cada uno de los ejemplos de formulación siguientes se describen asimismo a continuación.

60 <Material que contiene proteoglicano A>

[1] Se elimina el tejido no pertinente tal como piel o hueso del cartílago nasal de salmón, y el cartílago resultante se tritura con una picadora.

65 [2] Se añade agua corriente que presenta un pH de 6,0 a 7,5 en una cantidad (volumen) que es aproximadamente el doble o el triple de la cantidad del cartílago al cartílago nasal de salmón triturado, y se

agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

[3] Tras la agitación, los sólidos se separan y recogen.

5 [4] Las etapas [2] y [3] se realizan dos veces.

[5] Los sólidos resultantes son liofilizados.

10 [6] Los sólidos secos son pulverizados finamente con un pulverizador.

[7] Se añade 95% de etanol en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente diez veces la cantidad del cartílago nasal de salmón pulverizado al cartílago pulverizado finamente, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior.

15 [8] Tras la agitación, se separan y recogen los sólidos.

[9] Las etapas [7] y [8] se realizan dos veces.

20 [10] Los sólidos resultantes son evaporados hasta la sequedad.

<Material que contiene proteoglucano B>

25 [1] Se añade agua purificada que presenta un pH de 6,0 a 7,0 en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente diez veces la cantidad del material que contiene proteoglucano A al material que contiene proteoglucano A, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente) durante aproximadamente 30 minutos a 6 horas.

[2] Tras la separación y eliminación de los sólidos, se seca la disolución resultante para obtener sólidos.

30 <Material que contiene proteoglucano C>

[1] Se añade agua purificada que presenta un pH de 6,0 a 7,0 en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente diez veces la cantidad de material que contiene proteoglucano A al material que contiene proteoglucano A, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente) durante aproximadamente 30 minutos a 6 horas. A continuación, se separan y eliminan los sólidos, y se obtiene una disolución acuosa.

35 [2] Se añade etanol en una cantidad que es de aproximadamente cinco veces la cantidad de la disolución acuosa obtenida a la disolución acuosa, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

40 [3] Los sólidos resultantes se recogen y secan.

45 <Material que contiene proteoglucano D>

[1] El tejido no pertinente tal como piel o hueso se elimina del cartílago nasal de salmón, y el cartílago resultante se tritura con una picadora.

50 [2] Se añade agua purificada que presenta un pH de 6,5 a 7,5 en una cantidad (volumen) que es aproximadamente igual a o el doble de la cantidad del cartílago al cartílago nasal de salmón triturado, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

[3] Tras la agitación, los sólidos son separados y recogidos.

55 [4] Las etapas [2] y [3] se realizan tres veces.

[5] Los sólidos resultantes son pulverizados finamente con un pulverizador en húmedo.

60 [6] Se añade 95% de etanol en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente diez veces la cantidad del cartílago nasal de salmón pulverizado finamente al cartílago pulverizado finamente, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

[7] Tras la agitación, se separan y recogen los sólidos.

65 [8] Las etapas [6] y [7] se realizan una vez.

[9] Los sólidos resultantes se evaporan hasta la sequedad.

5 [10] Se añade agua purificada que presenta un pH de 6,5 a 7,5 en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente diez veces la cantidad de producto seco obtenido en la etapa [9] anterior al producto seco, y se sumerge el producto seco mientras se agita a una temperatura baja durante aproximadamente 12 a 48 horas.

[11] Tras la inmersión, se separan y eliminan los sólidos, y se obtiene una disolución acuosa.

10 [12] Se añade el alcohol etílico en una cantidad que es de aproximadamente cinco veces la cantidad de la disolución acuosa a la disolución acuosa, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

15 [13] Los resultados se recogen y secan.

<Material que contiene proteoglucano E>

20 [1] Se elimina tejido no pertinente tal como piel o hueso del cartílago nasal de salmón, y se pulveriza el cartílago resultante con una trituradora de carne.

[2] Se añade agua corriente que presenta un pH de 6,0 a 7,5 en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente cinco veces la cantidad del cartílago al cartílago nasal de salmón pulverizado, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

25 [3] Tras la agitación, se separan y recogen los sólidos.

[4] Las etapas [2] y [3] se realizan dos veces.

30 [5] Los sólidos resultantes se pulverizan finamente con un pulverizador en húmedo.

[6] Se añade 95% de etanol en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente cinco veces la cantidad del cartílago nasal de salmón pulverizado al cartílago pulverizado finamente, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

35 [7] Tras la agitación, se separan y recogen los sólidos.

[8] Las etapas [6] y [7] se realizan dos veces.

40 [9] Se añade agua purificada que presenta un pH de 6,0 a 7,0 en una cantidad (volumen) que es aproximadamente igual a o el doble de la cantidad de los sólidos resultantes a los sólidos, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior durante aproximadamente 30 minutos a 6 horas. A continuación se separan y eliminan los sólidos.

<Material que contiene proteoglucano F>

45 [1] Se elimina el tejido no pertinente tal como piel o hueso del cartílago nasal de salmón, y se tritura el cartílago resultante con un pulverizador en húmedo.

50 [2] Se añade agua corriente que presenta un pH de 6,0 a 7,5 en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente cinco veces la cantidad del cartílago al cartílago nasal de salmón triturado, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

[3] Tras la agitación, se separan y se recogen los sólidos.

55 [4] Las etapas [2] y [3] son realizadas dos veces.

[5] Los sólidos resultantes son pulverizados finamente con un pulverizador en húmedo.

60 [6] Se añade etanol (producto bajo las normas de aditivos alimenticios) en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente cinco veces la cantidad del cartílago nasal de salmón pulverizado finamente al cartílago pulverizado finamente, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

65 [7] Tras la agitación, se separan y recogen los sólidos.

[8] Las etapas [6] y [7] se realizan dos veces.

[9] Se añade agua purificada que presenta un pH de 6,0 a 7,0 en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente cinco veces la cantidad de sólidos resultantes a los sólidos, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior durante aproximadamente 30 minutos a 6 horas. A continuación se separan y eliminan los sólidos, y se obtiene una disolución acuosa.

[10] Se añade 95% de etanol en una cantidad que es aproximadamente diez veces la cantidad de la disolución acuosa obtenida a la disolución acuosa, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente). Los sólidos resultantes se recogen y se evaporan a continuación hasta la sequedad.

<Material que contiene proteoglucano G>

[1] Se elimina el tejido no pertinente tal como piel o hueso del cartílago nasal de salmón, y se tritura el cartílago resultante con un pulverizador en húmedo.

[2] Se añade agua corriente que presenta un pH de 6,0 a 7,5 en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente diez veces la cantidad del cartílago al cartílago nasal de salmón triturado, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

[3] Tras la agitación, se separan y recogen los sólidos.

[4] Las etapas [2] y [3] se realizan dos veces.

[5] Los sólidos resultantes se pulverizan finamente con un pulverizador en húmedo.

[6] Se añade 95% de etanol en una cantidad (volumen) que es de aproximadamente tres veces la cantidad de cartílago nasal de salmón pulverizado finamente al cartílago pulverizado finamente, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente).

[7] Tras la agitación, se separan y recogen los sólidos.

[8] Las etapas [6] y [7] se realizan tres veces.

[9] Se añade agua purificada que presenta un pH de 6,0 a 7,0 en una cantidad (volumen) que es aproximadamente dos o tres veces la cantidad de los sólidos resultantes a los sólidos, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior durante aproximadamente 30 minutos a 6 horas. A continuación, se separan y eliminan los sólidos, y se obtiene una disolución acuosa.

[10] Se añade cloruro sódico a la disolución acuosa tras la separación, y se satura la disolución con cloruro sódico.

[11] Se añade 95% de etanol en una cantidad que es de aproximadamente cinco veces la cantidad de la disolución acuosa a la disolución acuosa, y se agita suficientemente a una temperatura de 40°C o inferior (temperatura ambiente). Los sólidos resultantes se recogen y se evaporan a continuación hasta la sequedad.

En relación con los materiales que contienen proteoglucano A a D, se determina la cantidad de sacárido ácido en cada material mediante el procedimiento carbazol-ácido sulfúrico, y se determina la cantidad de proteoglucano en cada material a partir de la proporción de área de cada cromatograma correspondiente. La proporción de masa de sacárido ácido y proteoglucano para cada material sobre una base de masa seca es como se expone a continuación.

- A: Sacárido ácido: aproximadamente 35% de proteoglucano: aproximadamente 15%
- B: Sacárido ácido: aproximadamente 45% de proteoglucano: aproximadamente 18%
- C: Sacárido ácido: aproximadamente 55% de proteoglucano: aproximadamente 23%
- D: Sacárido ácido: aproximadamente 60% de proteoglucano: aproximadamente 24%

[Ejemplos de formulación]

Ejemplo de formulación 1: Loción

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucano E	5,0
Alcohol etílico	20,0
1,3-butilén glicol	5,0

ES 2 566 551 T3

fenoxietanol	0,7
Aceite de ricino hidrogenado oxietilenado (60 E.O.)	0,3
Aceite de ricino hidrogenado oxietilenado (40 E.O.)	0,05
ácido cítrico	0,08
citrato sódico	0,08
polietilenglicol (peso molecular medio: un millón)	0,03
Perfume	0,03
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de formulación 2: suero

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono G	2,0
Alcohol etílico	10,0
glicerina concentrada	10,0
1,3-butilén glicol	6,0
fenoxietanol	0,7
Aceite de ricino hidrogenado oxietilenado (60 E.O.)	0,5
Fosfolípido de soja hidrogenada	0,5
goma xantana	0,4
ácido cítrico	0,08
Citrato sódico	0,08
Perfume	0,1
agua purificada	Equilibrio
total	100,0

5 Ejemplo de formulación 3: Emulsión

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono D	0,2
Alcohol etílico	10,0
1,3-butilén glicol	5,0
Glicerina concentrada	5,0
Polímero de carboxivinilo	0,5
Fenoxietanol	0,5
Aceite de ricino hidrogenado oxietilenado (60 E.O.)	0,3
Hidróxido de potasio	0,3
aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado (40 E.O.)	0,1
Ácido cítrico	0,05
Citrato sódico	0,05
Edetato disódico	0,05
Perfume	0,1
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de formulación 4: crema

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono A	5,5
Glicerina concentrada	10,0
Aceite de oliva	8,0
Escualano	6,0
Monoestearato de poliglicerilo	4,0
Monoestearato de glicerilo lipófilo	4,0
Ácido esteárico	4,0
Alcohol etílico	3,0
Cetanol	3,0
Polímero de carboxivinilo	0,2
Hidróxido de potasio	0,6
Perfume	0,1
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de formulación 5: Restaurador capilar

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono C	0,05
Aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado (60 E.O.)	0,5
Goma xantana	0,3
Clorhidrato de piridoxina	0,2
Nicotinato de bencilo	0,02
1-mentol	0,1
Perfume	0,03
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de formulación 6: Tónico capilar

5

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono F	0,005
Alcohol etílico	50,0
Goma xantana	0,3
Líquido de alcanolamina de resina acrílica	0,1
1-mentol	0,2
Perfume	0,01
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de formulación 7: Loción para disminuir los tamaños de los poros de la piel

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono B	0,1
Alcohol etílico	15,0
Goma xantana	0,15
1-3-butilén glicol	5,0
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de formulación 8: Bebida de arroz integral en polvo

10

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono C	23,0
Pasta de sésamo negro	15,0
Azúcar moreno en polvo	8,0
Polvo de soja	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de formulación 9: Comprimido

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono D	40,0
Maltitol	10,0
Lactosa	36,0
Éster de ácidos grasos de sacarosa	5,0
Estearato de calcio	4,0
Dióxido de silicio	4,0
Sabor en polvo	1,0
Total	100,0

15

Ejemplo de formulación 10: Alimento en polvo

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono B	5,5
Fructosa	30,0
Dextrina	52,4
Sabor a menta	3,0
Ácido ascórbico	2,5
Sacaralosa	0,1

Sabor a limón	2,0
Total	100,0

Ejemplo de formulación 11: Píldora

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono A	23,0
Galactosa	30,0
Eritritol	10,0
Sacaralosa	0,06
Ácido cítrico	5,0
1-mentol	1,0
Éster de ácidos grasos de sacarosa	5,0
Celulosa cristalina	Equilibrio
Total	100,0

5 **Ejemplo de formulación 12: golosinas**

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono E	0,5
Jarabe de almidón de maltosa reductora	52,0
Lactosa	10,0
Ácido cítrico	7,0
Sabor a mentas	1,5
Sabor a hierbabuena	1,0
Sabor a melocotón	2,5
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de formulación 13: Comprimido masticable

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono G	1,0
Glucosa	30,0
Eritritol	20,0
Éster de ácidos grasos de sacarosa	4,0
Aspartamo	0,15
Sabor a hierbabuena	3,0
Celulosa cristalina	Equilibrio
Total	100,0

10

Ejemplo de formulación 14: Té en polvo

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono F	0,01
Polvo de extracto de agua de té oolong	10,0
Polvo de extracto de agua de <i>Coix lacryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>	5,0
Polvo de extracto de agua de té verde	5,0
Glucosa	10,0
Sacaralosa	0,1
Dextrina	Equilibrio
Total	100,0

15

Ejemplo de formulación 15: Cápsula

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono D	80,0
Celulosa cristalina	20,0
Total	100,0

Ejemplo de formulación 16: Chicle

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteoglucono B	0,05
Base de goma	20,0

Jarabe de almidón reductor	18,0
Sabor	1,0
Azúcar en polvo	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de formulación 17: Gel oral

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteogluano B	0,05
Glicerina	10,0
Propilenglicol	5,0
Hidroxietil celulosa	1,0
Aceite de ricino hidrogenado polioxietileno (60)	0,2
Goma xantana	0,2
Sabor	0,1
Etil p-hidroxibenzoato	0,1
Sacarina sódica	0,01
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

5 **Ejemplo de formulación 18: Bálsamo oral**

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteogluano D	5,0
Goma laca	10,0
Alcohol etílico	40,0
Hidroxietil celulosa	0,3
Sabor	2,0
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de formulación 19: Enjuague bucal

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteogluano F	0,01
Glicerina	10,0
Propilenglicol	3,0
Aceite de ricino hidrogenado polioxietileno (40)	0,4
Sabor	0,1
Regulador de pH	Cantidad adecuada
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

10

Ejemplo de formulación 20: Dentífrico líquido

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteogluano C	0,02
Glicerina	11,0
Propilenglicol	3,0
Aceite de ricino hidrogenado polioxietileno (60)	0,4
Sabor	0,1
Sacarina sódica	0,01
Regulador del pH	Cantidad adecuada
Agua purificada	Equilibrio
Total	100,0

15

Ejemplo de formulación 21: Dentífrico

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteogluano A	14,5
Sorbitol	45,0
Sílice abrasiva	18,0
Sílice espesante	3,0
Polietilenglicol 400	3,0
Sabor	1,0

ES 2 566 551 T3

Aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado (40)	0,5
Carboximetilcelulosa de sodio	0,4
Sacarina sódica	0,2
Regulador del pH	Cantidad adecuada
Agua purificada	Equilibrio
<hr/>	
Total	100,0

Ejemplo de formulación 22: Aerosol bucal

Componentes	Cantidad %
Material que contiene proteogluano G	0,01
Etanol	30,0
Glicerina	10,0
Aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado (60)	1,0
Sabor	1,0
1-mentol	0,5
Sacarina sódica	0,1
Regulador del pH	Cantidad adecuada
Agua purificada	Equilibrio
<hr/>	
Total	100,0

REIVINDICACIONES

- 5 1. Material que contiene proteoglucono que comprende proteoglucono y sacárido ácido como componentes sacáridos ácidos obtenido a partir de cartílago de pescado por extracción, en el que el material que contiene proteoglucono comprende un componente sacárido ácido que presenta un peso molecular no inferior a 5.000 kDa.
2. Material que contiene proteoglucono según la reivindicación 1, en el que el 50% en masa o más de los componentes sacáridos ácidos presenta un peso molecular no inferior a 2.000 kDa.
- 10 3. Material que contiene proteoglucono según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el 20% en masa o más de los componentes sacáridos ácidos presenta un peso molecular no inferior a 10.000 kDa.
- 15 4. Material que contiene proteoglucono según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que 20% en masa o más de los componentes sacáridos ácidos es el proteoglucono.
5. Material que contiene proteoglucono según la reivindicación 1 a 4, en el que el proteoglucono y el sacárido ácido como componentes sacáridos ácidos son obtenidos a partir de cartílago de pescado mediante extracción de agua.
- 20 6. Composición alimenticia o de bebida que comprende el material que contiene proteoglucono según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Composición oral que comprende el material que contiene proteoglucono según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 25 8. Composición cosmética que comprende el material que contiene proteoglucono según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Fig. 1

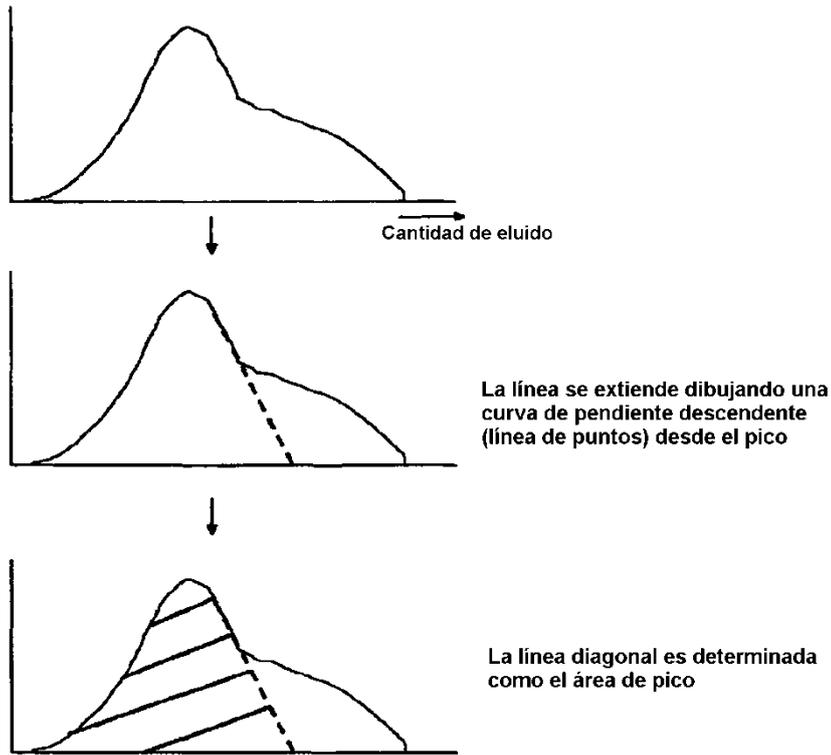


Fig. 2

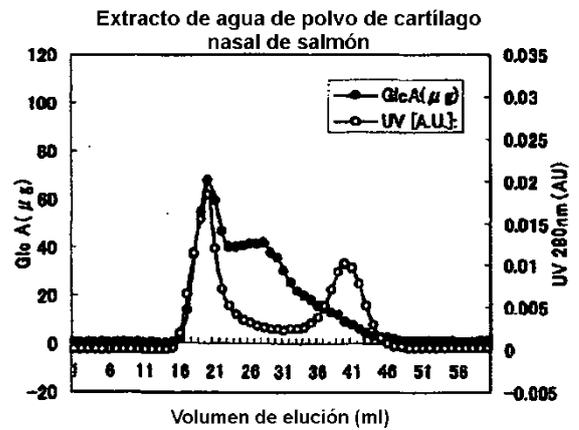
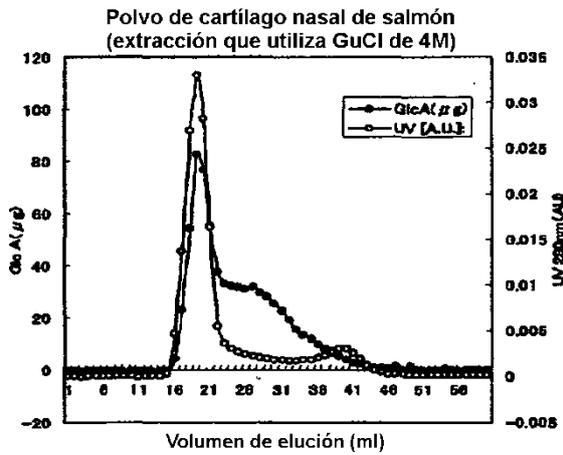


Fig. 3

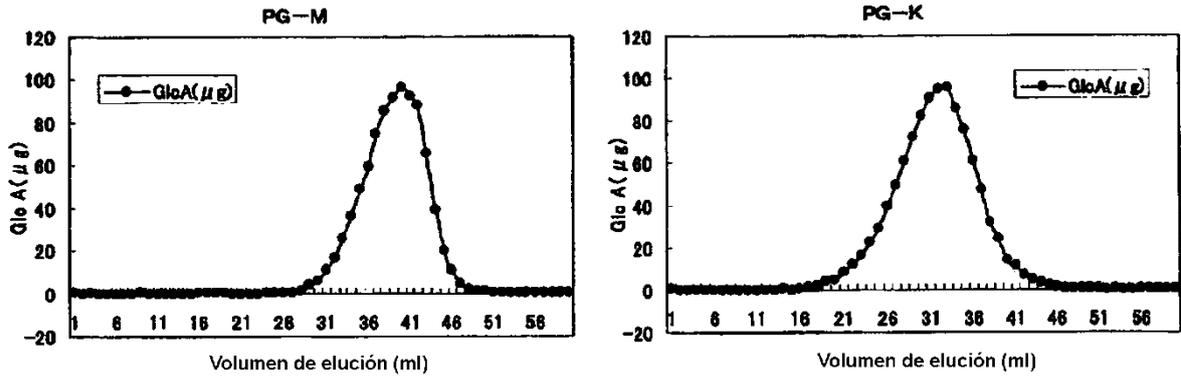


Fig. 4

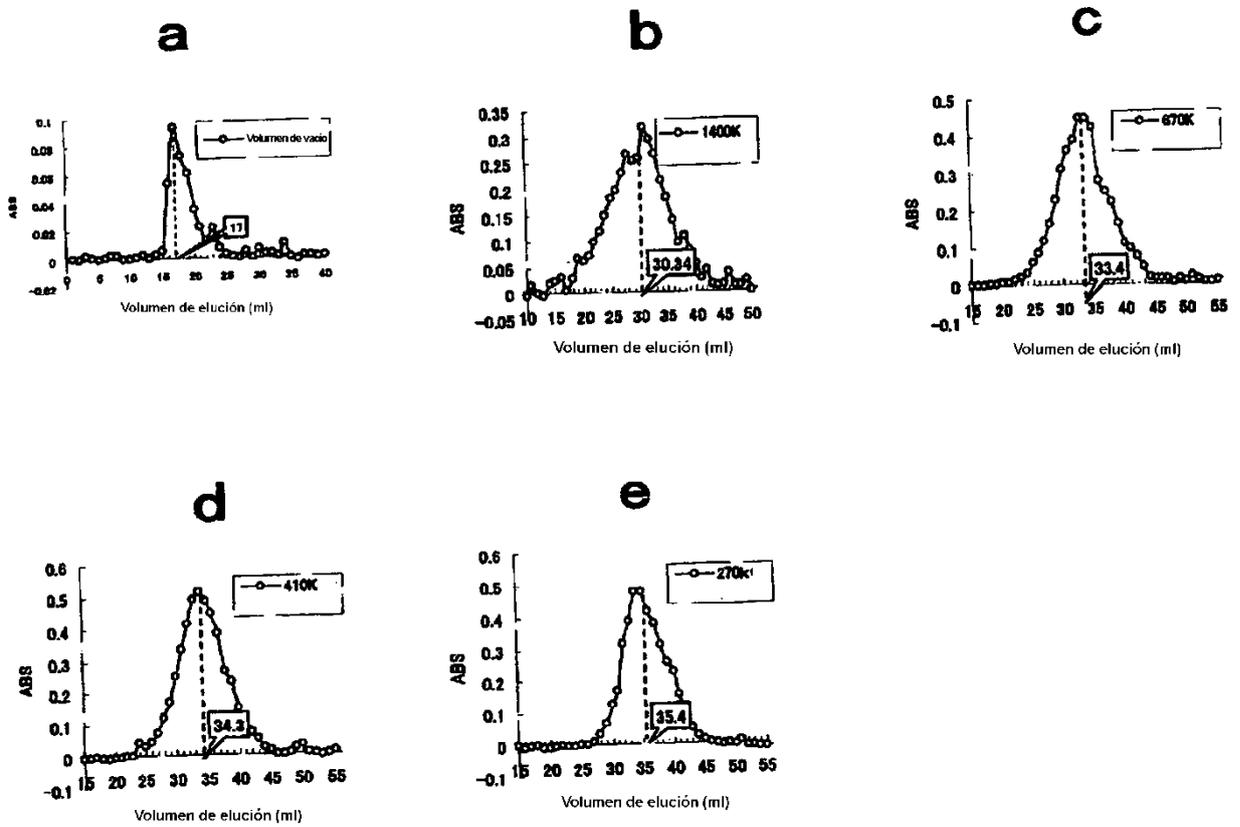


Fig. 5

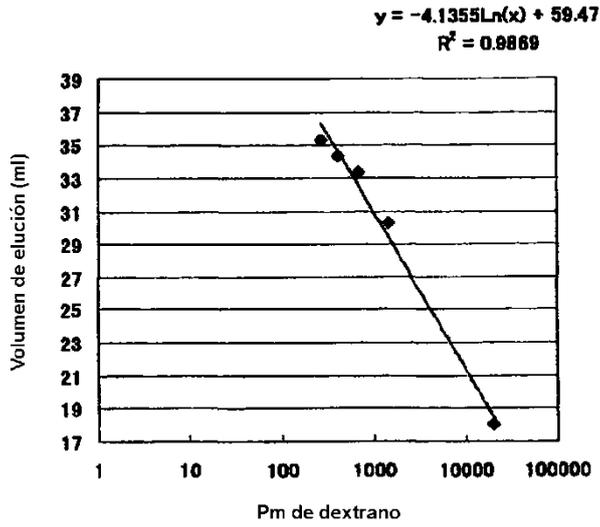


Fig. 6

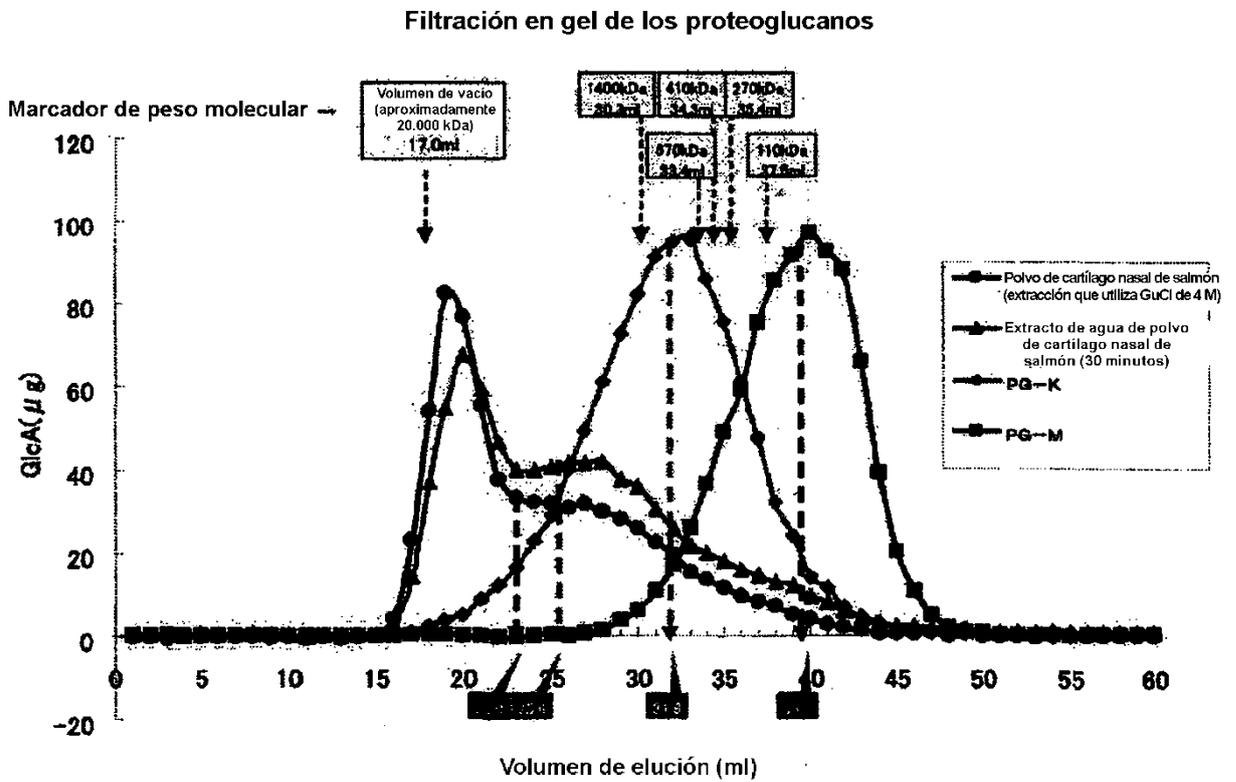


Fig. 7

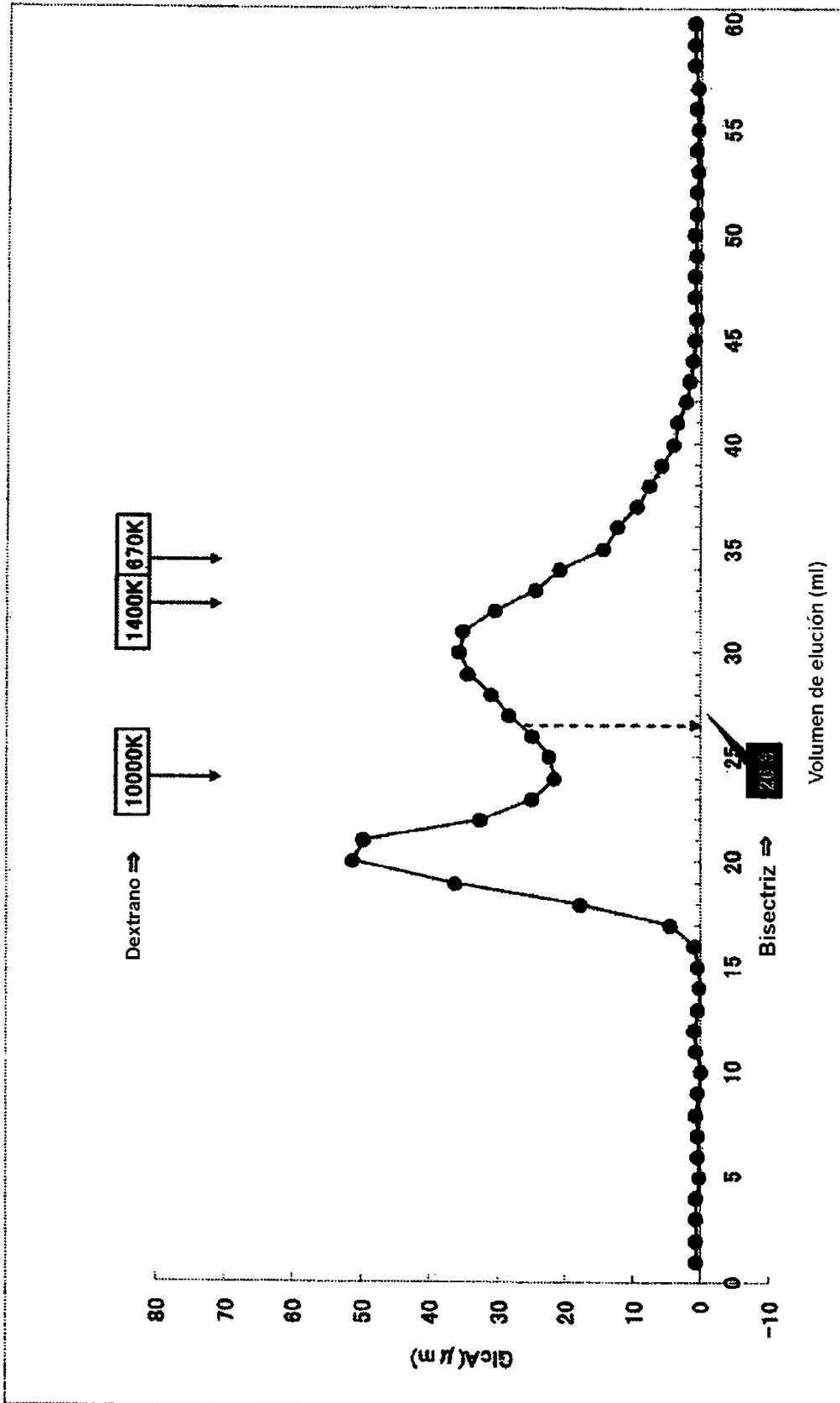


Fig. 8

Número de células 5 días después de la adición de las muestras

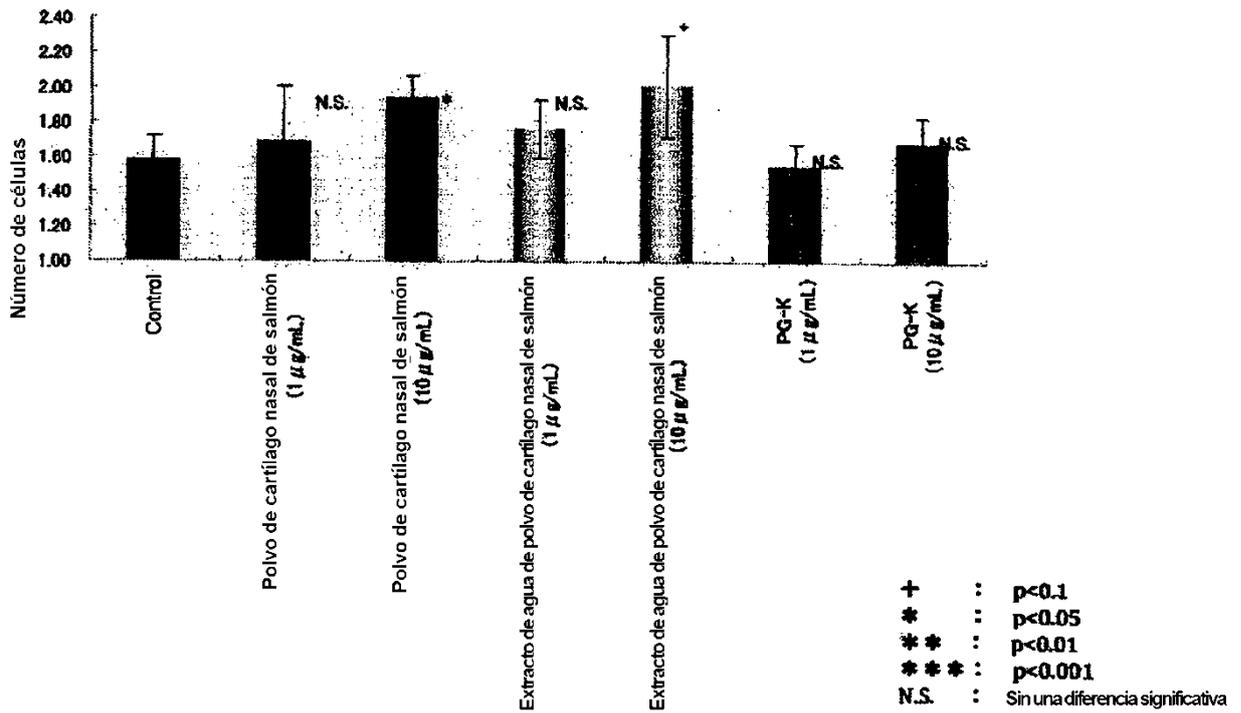


Fig. 9

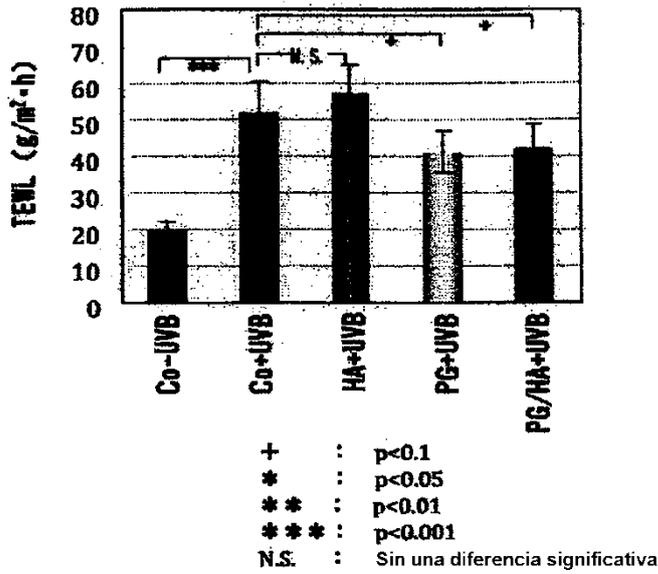


Fig. 10

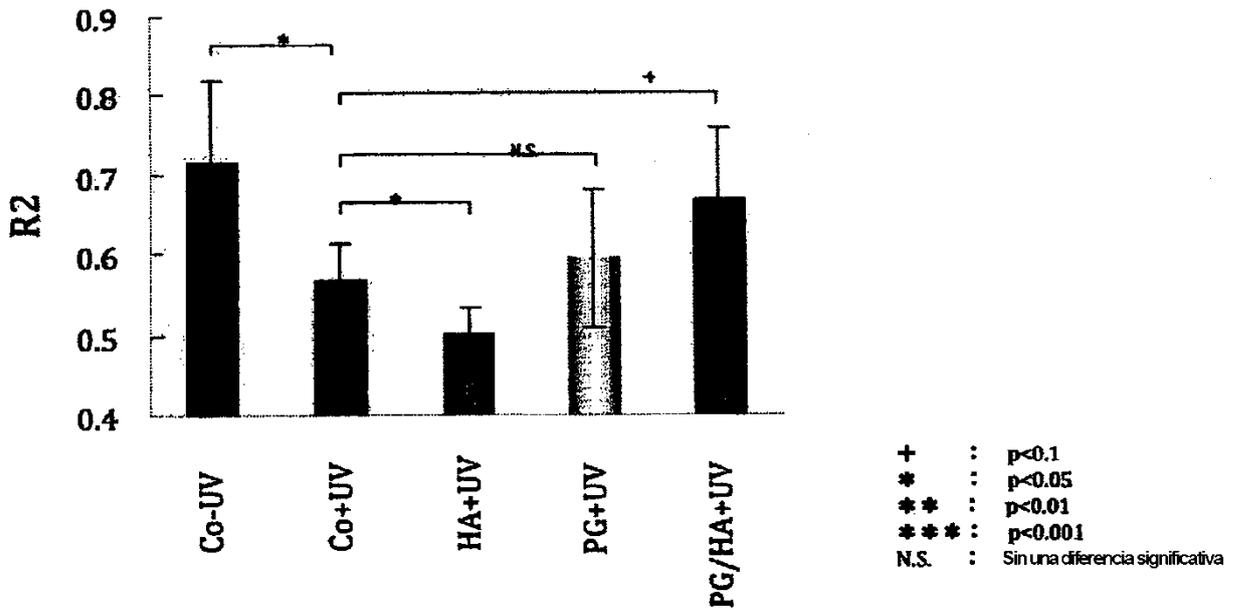


Fig. 11

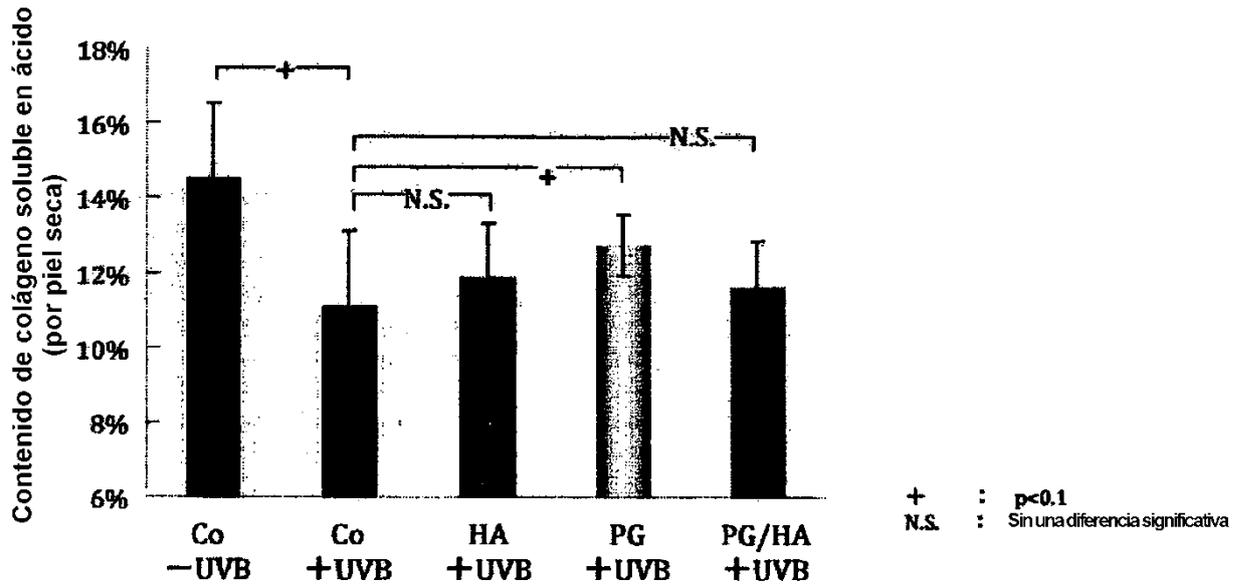


Fig. 12

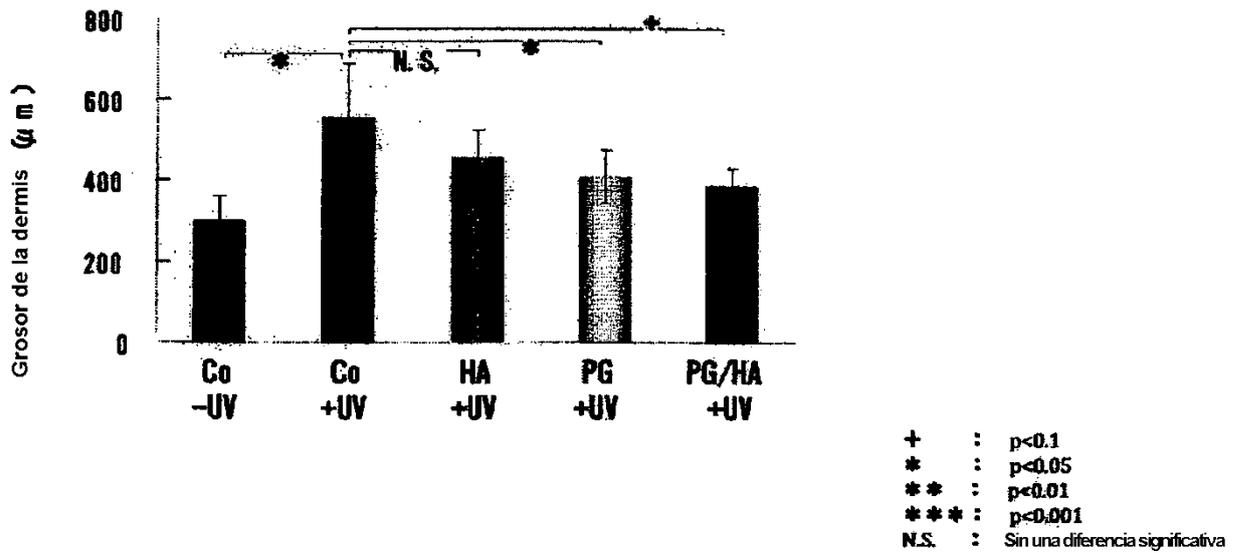


Fig. 13

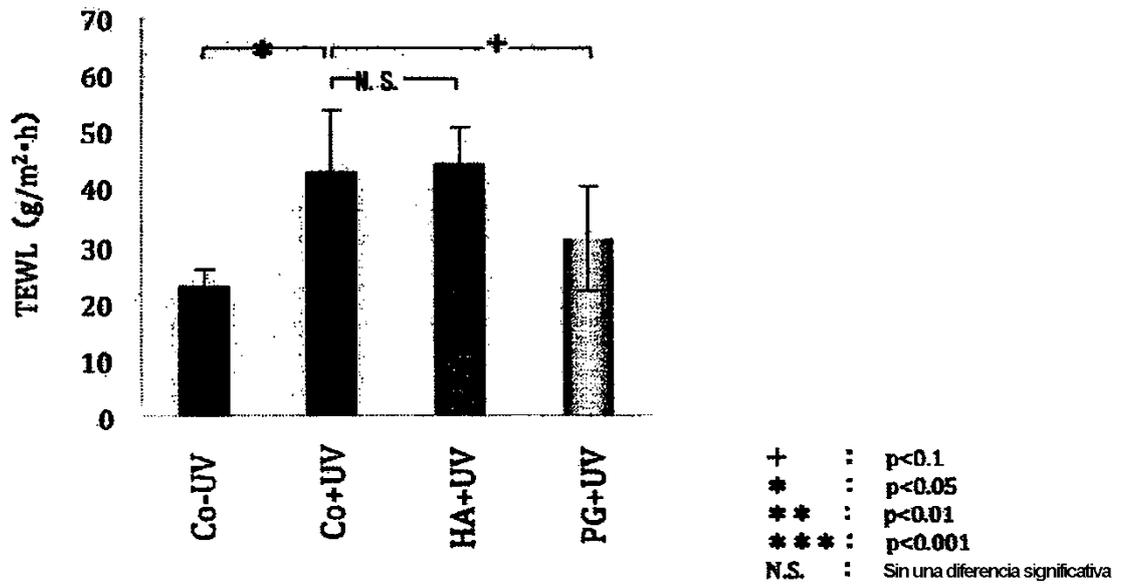


Fig. 14

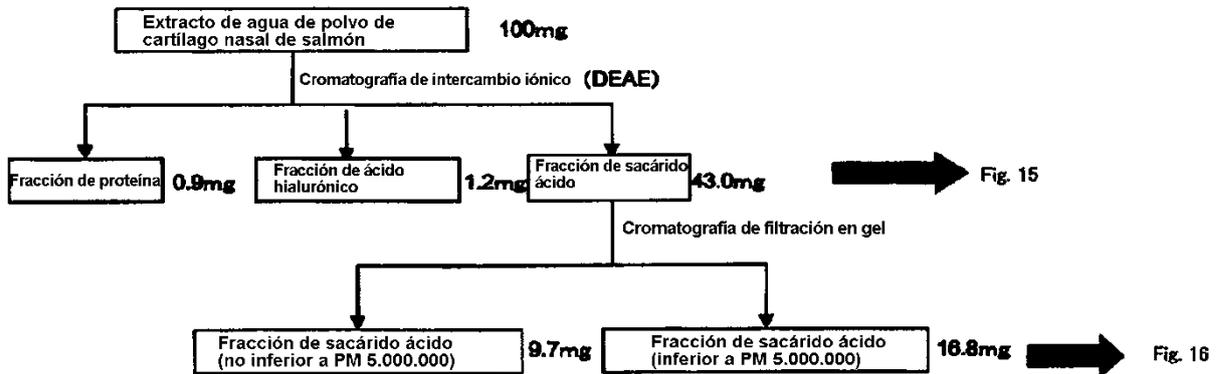


Fig. 15

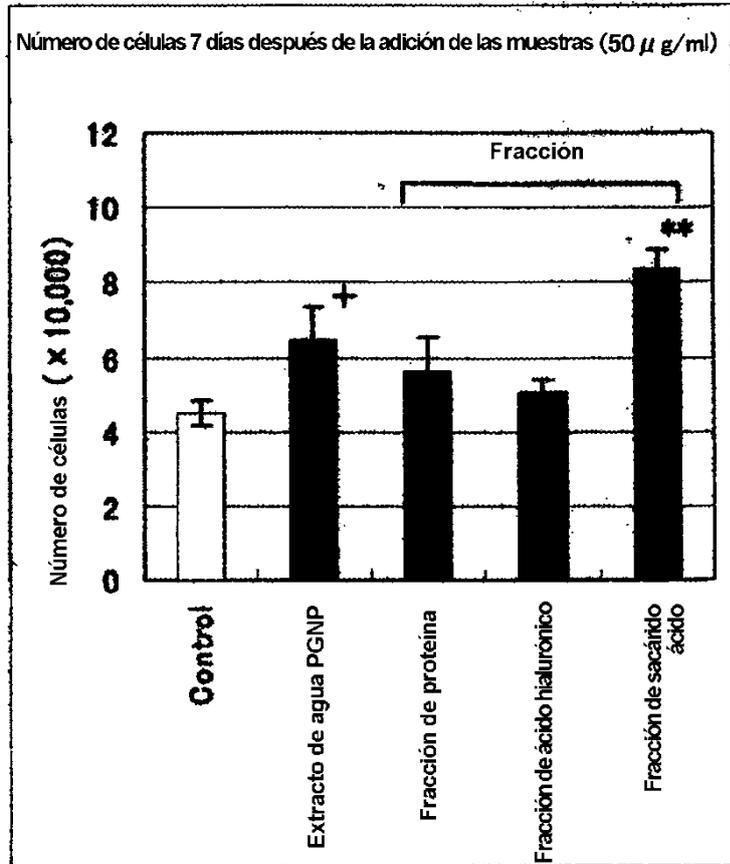


Fig. 16

