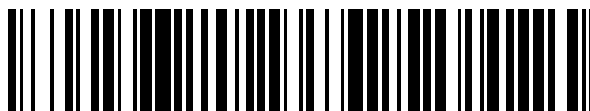


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 364**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2012** **PCT/EP2012/062252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012** **WO12175742**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2012** **E 12729969 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 2723311**

54 Título: **Métodos para la producción de una composición cosmética que comprende leucolectina y usos de la misma**

30 Prioridad:

24.06.2011 GB 201110777

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

25.01.2018

73 Titular/es:

AQUA BIO TECHNOLOGY ASA (100.0%)
Fornebuveien 42-44
1366 Fornebu, NO

72 Inventor/es:

WALTHER, BERNT TH;
LEREN, HANS KRISTIAN y
FAGOT, FANNY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 651 364 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

Métodos para la producción de una composición cosmética que comprende leucolectina y usos de la misma

- 5 La presente invención se refiere al uso de un polipéptido, que puede derivar de líquido de incubación de *Salmonidae*, en diversas aplicaciones para la piel. En particular, el polipéptido como se define en el presente documento, y composiciones que comprenden dicho polipéptido, son útiles para alterar, preferentemente mejorar, la apariencia cosmética de piel envejecida o cicatrizada.
- 10 La piel es uno de los órganos más vulnerables del cuerpo. La piel está en constante interacción con estímulos externos, directa o indirectamente, y se expone frecuentemente a, y se ve afectada por, agentes ambientales. De hecho, la piel puede verse como el primer punto de contacto con el mundo exterior. Esta exposición constante puede dar como resultado cambios físicos y visibles desagradables y/o indeseados a la piel, particularmente a la apariencia cosmética de la piel. Aunque dichos cambios pueden no poner en riesgo la salud de un individuo, dichos cambios
- 15 pueden ser físicamente incómodos o visiblemente desagradables. De hecho, debido a que la piel es tan visible, los cambios en la apariencia de la piel pueden conducir a estrés psicológico. Existe por tanto una necesidad y demanda continuada de tratamientos eficaces para mantener, restaurar o mejorar la condición de la piel, y en particular restaurar la apariencia juvenil de la piel.
- 20 La piel forma el órgano más grande del cuerpo, representando aproximadamente el 12-16 por ciento del peso de una persona. Realiza muchos papeles vitales tanto como barrera como como una influencia reguladora entre el mundo exterior y el ambiente controlado dentro de nuestros cuerpos.
- 25 La piel consiste en 3 capas, concretamente la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis es la capa epitelial superior de la piel. Actúa como una barrera física, evitando la pérdida de agua del cuerpo y evitando la entrada de sustancias y organismos en el cuerpo. Su grosor varía según el sitio del cuerpo.
- 30 La epidermis consiste en epitelio escamoso estratificado, es decir consiste en capas de células aplanadas. La piel, el pelo y las uñas están queratinizadas, lo que significa que tienen una superficie hidrófoba endurecida, muerta, hecha de una proteína llamada queratina. La epidermis se hace impermeable debido a sus contenidos de lípidos extracelulares asociados con queratinocitos, especialmente en la capa media de la epidermis (estrato lúcido). Las membranas mucosas (por ejemplo, del esófago, la cavidad faríngea oral, órganos reproductores y otros) son principalmente no queratinizadas y húmedas. La epidermis tiene tres tipos principales de células, concretamente queratinocitos (células cutáneas), melanocitos (células productoras de pigmentos) y células de Langerhans (células inmunitarias). La célula de Merkel es una cuarta célula epidérmica, menos prevalente.
- 35 Los queratinocitos maduran y se diferencian con acumulación de queratina a medida que se mueven hacia afuera. Con el tiempo se caen o se desprenden por roce. Forman cuatro o cinco estratos definidos, que son desde el más superficial al más profundo (i) el estrato córneo (capa córnea) con células duras, secas, muertas sin núcleos, (ii) el estrato granuloso (capa granulosa) con células que contienen gránulos basófilos y separadas hacia fuera del estrato córneo por el estrato lúcido fino, (iii) el estrato espinoso (capas de células espinosas) en el que las células se aplanan crecientemente a medida que se mueven hacia arriba y (iv) el estrato basal (capa basal) con células regenerativas columnares (altas).
- 40 Inmediatamente debajo de la epidermis está la membrana basal, una estructura especializada que queda entre la epidermis y la dermis.
- 45 La dermis es el tejido conectivo fibroso o capa de apoyo de la piel. Las fibras principales son fibras de colágeno y elastina que están entrelazadas.
- 50 La hipodermis es la capa de grasa inmediatamente debajo de la dermis y la epidermis. También se denomina tejido subcutáneo o panículo. La hipodermis consiste principalmente en células grasas (adipocitos), nervios y vasos sanguíneos.
- 55 Se crean nuevas células cutáneas epiteliales en la capa inferior de la piel, el estrato granuloso. Con el tiempo, las células migran a la superficie de la piel y se hacen más ácidas. Durante su viaje de 30 días, mueren y se saturan de queratina. La queratina y los lípidos asociados son importantes porque protegen a la piel de elementos externos.
- 60 Muchos factores contribuyen al deterioro de la apariencia cosmética de la piel incluyendo enfermedad, lesión, factores ambientales, edad, niveles hormonales, medicación, materiales aplicados de forma externa o ingerida, condiciones genéticas o una combinación de estos y otros factores. El deterioro relacionado con la edad de la apariencia cosmética de la piel es un factor universal, particularmente fotoenvejecimiento, es decir dermatoheliosis. Este deterioro puede verse en irregularidades o anomalías de la piel, que pueden aparecer como, por ejemplo, piel seca, arrugas, líneas finas, mayor laxitud (flacidez) o pigmentación alterada.
- 65

El fotoenvejecimiento es un término usado para los cambios característicos inducidos por exposición a UVA y UVB crónica. El deterioro de las funciones biológicas y la capacidad para controlar la tensión metabólica es una de las consecuencias principales del proceso de envejecimiento. El envejecimiento es un proceso progresivo, complejo, que también conduce a cambios funcionales y estéticos en la piel.

El fotoenvejecimiento es un proceso de envejecimiento de la piel atribuido a exposición a largo plazo, continua, de la piel a radiación ultravioleta (UV) de aproximadamente 245-290 nm, que puede ser de luz natural o sintética. El fotoenvejecimiento también se conoce por lo tanto como envejecimiento de la piel, particularmente de la cara, las orejas, el cuello y las manos, provocado por rayos UVA y UVB.

La piel seca y/o escamosa es una de las señales más habituales del envejecimiento de la piel. Aunque ciertos individuos son más susceptibles a tener piel seca y/o escamosa, la apariencia de piel seca y/o escamosa puede afectar a cualquier persona, independientemente de la edad, el sexo o el tipo de piel.

La piel seca se produce cuando se reduce el agua de la capa externa de la piel (el estrato córneo con el estrato lúcido), es decir, mediante pérdida de agua transepidérmica (PATE). Cuando esta capa está bien humedecida, minimiza la pérdida de agua a través de la piel y ayuda a mantener fuera irritantes, alérgenos y gérmenes. Sin embargo, cuando el estrato córneo se seca, se reduce su función protectora. Esto permite una mayor pérdida de agua, que deja la piel vulnerable a factores ambientales.

Idealmente el estrato córneo tiene un contenido de agua del 10 % al 30 %. Esta agua proporciona a la piel su textura blanda, suave y flexible, es decir las características asociadas con la apariencia juvenil de la piel. El agua viene de la atmósfera, de las capas subyacentes de la piel y el sudor. El aceite producido por las glándulas cutáneas y sustancias grasas producidas por células cutáneas actúan como humectantes naturales, permitiendo que el estrato córneo selle el agua.

El cuerpo pierde continuamente agua de la superficie de la piel por evaporación (PATE). En condiciones normales, la velocidad de pérdida es lenta, y el agua se reemplaza de forma adecuada. Se producen señales y síntomas característicos de piel seca cuando la pérdida de agua supera el reemplazo de agua, y el contenido de agua del estrato córneo cae por debajo del 10 %.

Son altamente deseables hidratantes que mejoren o erradiquen la piel seca y/o escamosa, mejorando de este modo la apariencia cosmética de la piel. Aunque se conocen en la técnica muchos hidratantes, sigue existiendo la necesidad de productos naturales que sean eficaces pero suaves.

Las células epidérmicas que muestran una pigmentación indeseada o excesiva, es decir hiperpigmentación, por ejemplo, manchas cutáneas, es otra señal habitual del envejecimiento de la piel. Tradicionalmente puede usarse exfoliación para retirar células epidérmicas que son perjudiciales para la apariencia cosmética de la piel.

La exfoliación elimina los estratos externos de la epidermis para revelar las nuevas células cutáneas debajo. Puede conseguirse exfoliación por medios físicos (es decir abrasión de la piel) o por medios químicos. Los exfoliantes químicos incluyen exfoliantes que contienen ácido salicílico, ácido glicólico, enzimas de la fruta, ácido cítrico o ácido málico y pueden aplicarse en altas concentraciones por un dermatólogo, o en concentraciones más bajas en productos sin receta. La exfoliación química puede implicar el uso de productos que contengan alfa hidroxiácidos (AHA) o beta hidroxiácidos (BHA), o enzimas que actúan para desprender las sustancias de tipo pegamento que mantienen las células juntas en uniones celulares, permitiendo que se separen con facilidad. Este tipo de exfoliación está recomendada para personas que se tratan el acné.

La mayor desventaja de la exfoliación es el alto precio de algunos de los productos y métodos usados para conseguirla. La exfoliación conducirá a alguna rojez inicial de la piel. Cerca del final de la exfoliación química, la piel se escarchará, con colores que varían desde un blanco brillante a gris en la superficie de la piel.

Por lo tanto, son deseables métodos eficaces para reducir la hiperpigmentación de la piel, que sean más suaves en la piel que la exfoliación.

Además del envejecimiento, el daño físico puede reducir la apariencia cosmética/estética de la piel. Por ejemplo, el daño superficial a las capas superiores (superficiales) de la piel, es decir epidermis y/o dermis mediante, por ejemplo rasguños, arañazos, etc. puede dar como resultado imperfecciones indeseables en la piel. El daño físico a la piel, tal como el provocado por heridas, cortes, infección, acné, etc. puede dar como resultado cicatrización.

Las heridas son lesiones externas o internas provocadas por, entre otros, medios mecánicos, químicos, térmicos o patógenos que dan como resultado la alteración física de la integridad del tejido estructural.

Las cicatrices son áreas de tejido fibroso (fibrosis) que reemplazan la piel normal después de una lesión. Una cicatriz resulta del proceso biológico de la reparación de heridas en la piel y otros tejidos del cuerpo. Por lo tanto, la

cicatrización es una parte natural del proceso de curación. Con la excepción de lesiones muy menores, cada herida (por ejemplo después de un accidente, una enfermedad o cirugía) da como resultado algún grado de cicatrización.

El tejido cicatricial es tanto funcional como cosméticamente inferior al tejido no lesionado normal. Se cree que esta inferioridad es una consecuencia de la disposición de haces de colágeno dentro de la dermis generados durante la formación de nuevo tejido. Los haces de colágeno dentro de la piel normal se disponen en una disposición entrelazada tridimensional compleja (denominada con frecuencia disposición de "ligamento Panamá"), que proporciona altos niveles de elasticidad y resistencia al daño, a la piel. Los haces de colágeno dentro del tejido cicatricial se disponen de una manera más plana, con haces orientados en paralelo a la superficie de la piel. Se cree que la pérdida de entrelazado tridimensional y su reemplazo con una disposición paralela de haces del colágeno es responsable de la pérdida de cosmética en sitios de tejido cicatricial.

La cicatrización también puede resultar de la alteración de capas individuales de la piel. Por ejemplo, las estrías están provocadas por desgarro de la dermis. Las estrías son con frecuencia el resultado del estiramiento rápido de la piel asociado con crecimiento rápido (habitual en la pubertad) o aumento de peso (por ejemplo embarazo, formación de músculos o aumento rápido de grasa) o, en algunos casos, alta fuerza de tracción en la piel que supera la elasticidad de la dermis. Las estrías también pueden estar influidas por cambios hormonales asociados con la pubertad, el embarazo, la formación de músculo, la terapia de reemplazo hormonal para transexuales, etc. Estos tipos de marcas se conocen como *striae atrophicae*, *striae vergetures*, *striae distensae*, *striae cutis distensae*, *striae gravidarum* (en casos en los que estén provocadas por el embarazo), *lineae atrophicae*, *linea albicante* o simplemente estrías.

Por tanto sigue existiendo la necesidad de tratamientos adecuados para promover la apariencia estética de la piel. En otras palabras, son deseables métodos para mejorar la apariencia cosmética de la piel. En particular, existe una demanda de métodos para restaurar la apariencia juvenil de la piel envejecida y/o combatir las señales del envejecimiento de la piel. También existe la necesidad de métodos para mejorar, restaurar o combatir la aparición de piel dañada en superficie, por ejemplo piel cicatrizada o imperfecciones resultantes de daño menor a la epidermis y/o dermis.

Se ha descubierto ahora sorprendentemente que ciertas moléculas que se encuentran en líquido de incubación de *Salmonidae*, concretamente un polipéptido que se conoce como leucolectina, son notablemente eficaces en la mejora de la apariencia cosmética de la piel, reduciendo particularmente las señales físicas asociadas con el envejecimiento de la piel y restaurando la aparición de piel dañada en superficie.

Inicialmente la proteína se identificó en y se purificó de peces y se describe en el documento WO 2010/049688. La proteína de salmón tiene 255 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). Esta es la forma propeptídica del polipéptido, que contiene un péptido N terminal de 19 aminoácidos que sugiere que se dirige al lisosoma para secreción posterior (es decir al espacio perivitelino).

La secuencia de aminoácidos del polipéptido permitió el desarrollo de anticuerpos específicos de epítipo, que a su vez permitieron la identificación de muchas isoformas de apariencia (2-8) de la proteína, dependiendo del tejido analizado. Se han aislado al menos dos ARNm de salmón, que contienen diferencias de secuencia menores que dan como resultado solamente 7 cambios en el nivel polipeptídico. También se han identificado formas truncadas de la proteína de leucocitos de salmón (véase SEQ ID NO: 2).

La proteína tiene poca similitud con cualquier proteína conocida, mostrando una similitud general de menos del 50 % con cualquier proteína conocida. Se ha observado algo de similitud en dominios pequeños con taquillectinas.

Se ha descubierto sorprendentemente que estas proteínas tienen efectos pronunciados en la apariencia cosmética de la piel. Aunque sin desear quedar ligado a la teoría, los ejemplos demuestran que la leucolectina es capaz de inhibir la liberación de metaloproteinasas de matriz (MMP), que son endopeptidasas dependientes de zinc, de fibroblastos dérmicos. Estas enzimas son capaces de degradar muchos tipos diferentes de proteínas presentes en la matriz extracelular de la piel, por ejemplo, colágeno, y se cree que la inhibición de la liberación de estas enzimas es, al menos en parte, responsable de los efectos de estas proteínas en la apariencia cosmética/estética de la piel.

En consecuencia, los polipéptidos como se describen en el presente documento pueden ser para su uso en, o usarse en métodos para, la promoción de la apariencia estética de la piel. En otras palabras, los polipéptidos como se describen en el presente documento pueden ser para su uso en, o usarse en métodos para, la mejora de la apariencia cosmética de la piel. Los polipéptidos como se describen en el presente documento pueden ser para su uso en, o usarse en métodos para, la restauración de la apariencia juvenil de la piel envejecida y/o combatir las señales de envejecimiento de la piel. Los polipéptidos como se describen en el presente documento pueden ser para su uso en, o usarse en métodos para, la mejora, restauración o la lucha contra la aparición de piel dañada en superficie, por ejemplo piel cicatricial o imperfecciones resultantes de daño menor a la epidermis y/o dermis.

Resultará evidente a partir de las divulgaciones posteriores que los polipéptidos como se describen en el presente documento pueden proporcionarse en composiciones cosméticas, que comprenden uno o más excipientes y/o diluyentes fisiológica o farmacéuticamente aceptables.

- 5 Por lo tanto, en un aspecto la presente invención proporciona un método para mejorar la apariencia cosmética de piel envejecida o cicatricial de un animal mamífero, en el que:

10 (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO 1-4 o una secuencia que es al menos 90 % idéntica a dicha secuencia, o una parte de cualquiera de dichas secuencias, en el que dicha parte comprende al menos 100 aminoácidos y es al menos 90 % idéntica a una región comparable de una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO 1-4; o

15 (ii) una composición cosmética que comprende (i) y uno o más excipientes y/o diluyentes fisiológica o farmacéuticamente aceptables,

se administra a dicho animal.

20 El uso de un polipéptido o composición cosmética como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para mejorar la apariencia cosmética de la piel de un animal mamífero también se desvela en el presente documento.

25 Los "polipéptidos" como se denominan en el presente documento son moléculas preferentemente con más de 100, 150, 200 o 250 restos y/o menos de 500, 400, 300 o 200 restos o un intervalo seleccionado de los mismos. Como se indica en el presente documento una "parte" preferentemente comprende al menos 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 o más aminoácidos de la secuencia de la que deriva. Dicha parte puede obtenerse de una parte central, N terminal o C terminal de la secuencia. Preferentemente dicha parte se obtiene del extremo N terminal, por ejemplo de los primeros 100 o 150 restos del polipéptido. Como alternativa se prefieren partes obtenidas del extremo C terminal, por ejemplo de los últimos 100 o 150 restos del polipéptido. Los aspectos particularmente preferidos incluyen truncamiento de dichos polipéptidos, por ejemplo para retirar un péptido señal o parte ausente en variantes de origen natural. Preferentemente se producen truncamientos en el extremo N terminal y son de 1 a 50, por ejemplo de 1 a 10, 20, 30 o 40, o de 5 a 40, por ejemplo de 10 a 35 restos de longitud.

Preferentemente dicha secuencia es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia con la que se compara.

35 La identidad de secuencia puede determinarse, por ejemplo, usando el banco de datos de secuencias de proteínas SWISS-PROT usando FASTA pep-cmp con un factor de pam variable y penalización de creación de huecos ajustada a 12,0 y penalización de extensión de huecos ajustada a 4,0, y una ventana de 2 aminoácidos. Preferentemente dicha comparación se realiza sobre la longitud completa de la secuencia, pero puede realizarse sobre una ventana de comparación más pequeña, por ejemplo de menos de 200, 100 o 50 aminoácidos contiguos.

40 Preferentemente dichos polipéptidos relacionados con la identidad de secuencia son funcionalmente equivalentes a los polipéptidos que se exponen en los n.^{os} de secuencia indicados. Dichos polipéptidos funcionalmente equivalentes pueden tomar la forma de derivados como se expone posteriormente. De forma similar, los polipéptidos con secuencias como se exponen en los n.^{os} de secuencia pueden modificarse sin afectar a la secuencia del polipéptido como se describe posteriormente.

45 Además, las "partes" como se describe en el presente documento pueden ser equivalentes funcionales. Estas partes satisfacen las condiciones de identidad (en relación con una región comparable) mencionadas en el presente documento.

50 Como se indica en el presente documento, para conseguir "equivalencia funcional" el polipéptido puede mostrar algo de reducción de la eficacia en la realización de la función cosmética en relación con la molécula parental (es decir la molécula de la que derivó, por ejemplo por sustitución de aminoácidos), pero preferentemente es igual de eficaz o es más eficaz. Por tanto, la equivalencia funcional se refiere a un polipéptido que es eficaz para mejorar la apariencia cosmética de la piel como se describe posteriormente en el presente documento. Esto puede ensayarse por comparación de los efectos del polipéptido derivado en relación con el polipéptido del que deriva de una manera cualitativa o cuantitativa, por ejemplo realizando los análisis *in vivo* indicados en los ejemplos. Cuando sean posibles resultados cuantitativos, el derivado es al menos 30, 50, 70 o 90 % tan eficaz como el polipéptido parental. Como alternativa, puede realizarse ensayo *in vitro*, por ejemplo mediante análisis de la inhibición de la liberación de MMP en cultivos celulares *in vitro*.

60 Pueden obtenerse proteínas funcionalmente equivalentes que están relacionadas con o derivan de la proteína de origen natural modificando la secuencia de aminoácidos nativa por sustitución, adición y/o supresión de aminoácidos individuales o múltiples (siempre que se satisfagan los requisitos de identidad de secuencia anteriormente mencionados), pero sin destruir la función de la molécula. Preferentemente, la secuencia nativa tiene menos de 20 sustituciones, adiciones o supresiones, por ejemplo menos de 10, 5, 4, 3, 2 o 1 de dichas modificaciones. Dichas

proteínas están codificadas por “moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes” que se generan por sustitución, adición y/o supresión apropiadas de una o más bases.

Son equivalentes funcionales preferidos las variantes de “adición” en las que se generan proteínas o polipéptidos de fusión amino y/o carboxilo terminales, que comprenden una proteína o un polipéptido adicional fusionado con el polipéptido parental.

Son variantes funcionalmente equivalentes particularmente preferidas variaciones biológicas naturales, particularmente variantes alélicas o variaciones geográficas dentro de una especie o como alternativa en géneros diferentes de la familia *Salmonidae*, especialmente las subfamilias *Salmo* y *Oncorhynchus* y derivados preparados usando técnicas conocidas. Las especies particularmente preferidas de la familia *Salmonidae* incluyen el salmón del atlántico (*Salmo salar*) y el salmón del pacífico (*Oncorhynchus masou*).

Los polipéptidos como se han descrito anteriormente, incluyen los que se modifican sin afectar a la secuencia del polipéptido, por ejemplo por modificación química, incluyendo por desglucosilación o glucosilación. Dichos polipéptidos pueden prepararse por modificación después del aislamiento del polipéptido sin afectar a la funcionalidad, por ejemplo cierta glucosilación, metilación, etc. de restos particulares.

Los polipéptidos para uso en los métodos de la presente invención o en composiciones de la invención también pueden tomar la forma de peptidomiméticos que pueden considerarse derivados en los que los elementos funcionales del polipéptido se conservan pero están presentados en el contexto de una estructura diferente, por ejemplo no peptídica. Dichos peptidomiméticos se han desarrollado con éxito y se han usado para otras aplicaciones, particularmente médicas.

Pueden generarse peptidomiméticos, particularmente moléculas no peptídicas, mediante diversos procesos, incluyendo diseño de fármacos de base conformacional, exploración, diseño de bibliotecas focalizado y química médica clásica. No solamente pueden usarse muchos oligómeros de aminoácidos no naturales u otros componentes básicos orgánicos, sino que también pueden usarse carbohidratos, compuestos heterocíclicos o macrocíclicos o cualquier molécula orgánica que comprenda elementos estructurales y conformación que proporcionen una superficie electrostática molecular que imite las mismas propiedades de la conformación tridimensional del péptido por métodos conocidos en la técnica.

Por lo tanto los peptidomiméticos pueden tener poca o ninguna similitud con una cadena principal peptídica. Los peptidomiméticos pueden comprender una forma no peptídica completamente sintética (por ejemplo basada en una cadena principal de carbohidratos con sustituyentes apropiados) o pueden conservar uno o más elementos del polipéptido en el que se basa, por ejemplo derivatizando uno o más aminoácidos o reemplazando uno o más aminoácidos con componentes no peptídicos alternativos. Los moldes de tipo péptido incluyen pseudopéptidos y péptidos cíclicos. Los elementos estructurales considerados redundantes para la función del péptido pueden minimizarse para conservar una función de almacén solamente o retirarse cuando sea apropiado.

Cuando los peptidomiméticos conserven uno o más elementos peptídicos, es decir más de un aminoácido, dichos aminoácidos pueden reemplazarse con un análogo no convencional o estructural del mismo. Los aminoácidos conservados en las secuencias también pueden derivatizarse o modificarse (por ejemplo marcarse, glucosilarse o metilarse) siempre que las propiedades funcionales de los polipéptidos desvelados en el presente documento se conserven. Los peptidomiméticos se denominan “derivables de” una cierta secuencia polipeptídica. Por esto se entiende que el peptidomimético se diseña con referencia a una secuencia polipeptídica definida, de modo que conserve los elementos estructurales del péptido que sean esenciales para su función. Esta puede ser las cadenas laterales particulares del polipéptido, o potencial de enlaces de hidrógeno de la estructura. Dichos elementos pueden proporcionarse por componentes no peptídicos o uno o más de los restos de aminoácidos o los enlaces que unen dichos restos de aminoácidos del polipéptido pueden modificarse para mejorar ciertas funciones del polipéptido tales como estabilidad o resistencia a proteasa, conservando al mismo tiempo los elementos estructurales del polipéptido que son esenciales para su función.

Son ejemplos de aminoácidos análogos estructurarles o no convencionales que pueden usarse los D aminoácidos, amida isoésteres (tales como N-metil amida, amida retroinversa, tioamida, tioéster, fosfonato, cetometileno, hidroximetileno, fluorovinilo, (E)-vinilo, metilamino, metilendio o alceno), L-N metilaminoácidos, D- α metilaminoácidos, D-N-metilaminoácidos. Se enumeran ejemplos de aminoácidos no convencionales en la Tabla 1.

TABLA 1

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
Ácido α -aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
α -amino- α -metilbutirato	Mgab	L-N-metilarginina	Nmarg
aminociclopropano-carboxilato	Cpro	L-N-metilasparagina	Nmasn
		L-N-ácido metilaspártico	Nmasp
Ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-metilcisteína	Nmcys
aminonorbomil-carboxilato	Norb	L-N-metilglutamina	Nmgln

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
ciclohexilalanina		L-N-ácido metilglutámico	Nmglu
ciclopentilalanina	Cpen	Quexa L-N-metilhistidina	Nmbis
D-alanina	Dal	L-N-metilsoleucina	Nmile
D-arginina	Darg	L-N-metilleucina	Nmleu
D-ácido aspártico	Dasp	L-N-metilisina	Nmlys
D-cisteína	Dcys	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-glutamina	Dgln	L-N-metilnorleucina	Nmnle
D-ácido glutámico	Dglu	L-N-metilnorvalina	Nmnva
D-histidina	Dhis	L-N-metilornitina	Nmorn
D-isoleucina	Dile	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-leucina	Dleu	L-N-metilprolina	Nmpro
D-lisina	Dlys	L-N-metilserina	Nmser
D-metionina	Dmet	L-N-metiltreonina	Nmthr
D-ornitina	Dorn	L-N-metiltryptófano	Nmtrp
D-fenilalanina	Dphe	L-N-metiltirosina	Nmtyr
D-prolina	Dpro	L-N-metilvalina	Nmval
D-serina	Dser	L-N-metiletilglicina	Nmetg
D-treonina	Dthr	L-N-metil- <i>t</i> -butilglicina	Nmtbug
D-tryptófano	Dtrp	L-norleucina	Nle
D-tirosina	Dtyr	L-norvalina	Nva
D-valina	Dval	α -metil-aminoisobutirato	Maib
D- α -metilalanina	Dmala	α -metil- γ -aminobutirato	Mgab
D- α -metilarginina	Dmarg	α -metilciclohexilalanina	Mchexa
D- α -metilasparagina	Dmasn	α -metilciclopentilalanina	Mcp
D- α -metilaspartato	Dmasp	α -metil- α -naftilalanina	Manap
D- α -metilcisteína	Dmcys	α -metilpenicilamina	Mpen
D- α -metilglutamina	Dmgln	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
D- α -metilhistidina	Dmhis	N-(2-aminooetil)glicina	Naeg
D- α -metilisoleucina	Dmile	N*(3-aminopropil)glicina	Norn
D- α -metilleucina	Dmleu	N-amino- α -metilbutirato	Nmaabu
D- α -metilisina	Dmlys	α -naftilalanina	Anap
D- α -metilmetionina	Dmmet	N-bencilglicina	Nphe
D- α -metilornitina	Dmorn	N-(2-carbamiletil)glicina	Ngln
D- α -metilfenilalanina	Dmphe	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
D- α -metilprolina	Dmpro	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D- α -metilserina	Dmser	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D- α -metiltreonina	Dmthr	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D- α -metiltryptófano	Dmtrp	N-cicloheptilglicina	Nchep
D- α -metiltirosina	Dmtyr	N-ciclohexilglicina	Nchex
D- α -metilvalina	Dmval	N-ciclododecilglicina	Ncdec
D-N-metilalanina	Dnmala	H-cilcododecilglicina	Ncdod
D-N-metilarginina	Dnmarg	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D-N-metilasparagina	Dnmasn	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D-N-metilaspartato	Dnmasp	N-cicloudecilglicina	Ncund
D-N-metilcisteína	Dnmcys	N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhm
D-N-metilglutamina	Dnmgln	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(1-hidroxietil)glicina	Nthr
D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(hidroxietil)glicina	Nser
D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(imidazoliletil)glicina	Nhis
D-N-metilisina	Dnmlys	N-(3-indoliletil)glicina	Nhtrp
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
D-N-metilornitina	Dnmorn	D-N-metilmetionina	Dnmmet
N-metilglicina	Nala	N-metilciclopentilalanina	Nmcp
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metilserina	Dnmser
D-N-metiltryptófano	Dnmtrp	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metiltirosina	Dnmtyr	N-(1-metiletil)glicina	Nval
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metila-naftilalanina	Nmanap
Ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-metilpenicilamina	Nmpen
L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-(<i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L-etilglicina	Etg	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-homofenilalanina	Hphe	penicilamina	Pen
		L- α -metilalanina	Mala

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
L-α-metilarginina	Marg	L-α-metilasparagina	Masn
L-α-metilaspartato	Masp	L-α-metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
L-α-metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
L-α-metilglutamina	Mgln	L-α-metilglutamato	Mglu
L-α-metilhistidina	Mhis	L-α-metilhomofenilalanina	Mhphe
L-α-metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
L-α-metilleucina	Mleu	L-α-metillisina	Mlys
L-α-metilmetionina	Mmet	L-α-metilnorleucina	Mnle
L-α-metilmorvalina	Mnva	L-α-metilornitina	Morn
L-α-metilfenilalanina	Mphe	L-α-metilprolina	Mpro
L-α-metilserina	Mser	L-α-metiltreonina	Mthr
L-α-metilriptófano	Mtrp	L-α-metiltirosina	Mtyr
L-α-metilvalina	Mval	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhph
N-(N-(2,2-difeniletíl)carbamilmetil)glicina	Nnbhm	N-(N-(3,3-difenilpropil)carbamilmetil)glicina	Nnbhe
1-carboxi-1-(2,2-difenil-etilamino)ciclopropano	Nmbc	L-O-metil serina	Omser
		L-O-metil homoserina	Omhsr

Los aminoácidos no convencionales que pueden usarse incluyen análogos restringidos conformacionalmente, por ejemplo tales como Tic (para reemplazar F), Aib (para reemplazar A) o ácido piperídico (para reemplazar Pro).

- 5 Los polipéptidos analizados anteriormente también incluyen derivados que se han modificado, por ejemplo para facilitar su uso en aplicaciones cosméticas (analizadas en el presente documento), por ejemplo mediante la adición de grupos de dirección o funcionales, por ejemplo para mejorar la lipofilicidad, ayudar al transporte celular, la solubilidad y/o la estabilidad. Por lo tanto pueden conjugarse oligosacáridos, ácidos grasos, alcoholes grasos, aminoácidos, péptidos o polipéptidos con los polipéptidos o las moléculas de ácido nucleico anteriormente mencionados.

Los polipéptidos también abarcan derivados en forma de "profármacos" o "propéptidos" de modo que el componente añadido pueda retirarse por escisión una vez administrado, por ejemplo mediante escisión de un sustituyente añadido mediante esterificación que puede retirarse mediante la acción de esterasas. Dichos profármacos incluyen precursores nativos de las proteínas de origen natural que se escinden por ejemplo por proteólisis para producir el polipéptido de interés. Dichos precursores pueden estar inactivos en la forma precursora pero pueden activarse por escisión proteolítica. Los polipéptidos modificados como se han descrito anteriormente pueden ensayarse para asegurar que conserven la actividad funcional en relación con la molécula no modificada determinando si tienen los mismos efectos médicos o efectos médicos similares.

Los polipéptidos usados en composiciones y métodos de la invención como se describen en el presente documento se obtienen o derivan de fuentes de origen natural.

Convenientemente los polipéptidos se aíslan de acuerdo con los protocolos descritos en los Ejemplos.

Por lo tanto en un aspecto adicional la presente invención proporciona un método para aislar un polipéptido como se describe en el presente documento que comprende al menos las etapas de:

- suspender huevos de peces en un volumen mínimo de agua (por ejemplo equivalente al volumen de los huevos o menor);
- inducir eclosión rápida, sincronizada de dichos huevos (preferentemente de modo que la eclosión se complete en menos de 2 horas para más del 95 % de los embriones);
- filtrar los huevos eclosionados para obtener el líquido de incubación; y
- filtrar el líquido de incubación para obtener el polipéptido, en el que la etapa de filtración del líquido de incubación comprende al menos las etapas de:

(i') filtrar el líquido de incubación usando un filtro con un tamaño de poro de al menos 5 µm y recoger el filtrado;

(ii') someter el filtrado de la etapa (i') a cromatografía de intercambio iónico que comprende:

- cargar el filtrado en una columna de DEAE (dietilaminoetilo);
- lavar la columna con una solución de lavado que comprende Tris-HCl 10-50 mM, pH 7-9;
- eluir el polipéptido de la columna usando un tampón de elución que comprende la solución de lavado que contiene además NaCl o KCl 10-500 mM; y
- recoger el eluato de la etapa (c),

(iii') intercambiar el agua en el eluato de la etapa (ii') con un tampón farmacéuticamente aceptable; y

(iv') filtrar la solución obtenida de la etapa (iii') usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 μm y recoger el filtrado, en el que dicho filtrado proporciona una composición que comprende dicho polipéptido o parte del mismo.

5 Opcionalmente, el producto obtenido u obtenible a partir del método anterior puede diluirse o concentrarse a una concentración apropiada antes de su uso en los métodos de la invención.

En una primera realización, la composición para uso en los métodos de la invención puede obtenerse o ser obtenible por un método que comprende al menos las etapas de:

- 10 a) suspender huevos de peces en un volumen mínimo de agua, preferentemente huevos de salmón;
 b) inducir la eclosión rápida, sincronizada, de dichos huevos, preferentemente de modo que la eclosión se complete en menos de 2 horas para más del 95 % de los embriones;
 c) filtrar los huevos eclosionados para obtener el líquido de incubación; y
 15 d) filtrar el líquido de incubación para obtener la composición, en el que la etapa de filtración del líquido de incubación comprende al menos las etapas de:

- (i) filtrar el líquido de incubación usando un filtro con un tamaño de poro de al menos 5 μm , preferentemente 5-15 μm y particularmente preferentemente un tamaño de poro de 7 μm , y recoger el filtrado;
 20 (ii) filtrar el filtrado de la etapa (i) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,30-0,60 μm , preferentemente un tamaño de poro de 0,35-0,55, particularmente preferentemente 0,40-0,50 μm , más preferentemente 0,45 μm y recoger el filtrado;
 (iii) intercambiar el agua en el filtrado de la etapa (ii) con un tampón farmacéuticamente aceptable;
 25 (iv) filtrar la solución obtenida de la etapa (iii) usando un filtro con un tamaño de exclusión de al menos 80 kDa, preferentemente 80-120 kDa, más preferentemente un tamaño de exclusión de 100 kDa y recoger el filtrado; y
 (v) filtrar el filtrado de la etapa (iv) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 μm , preferentemente un tamaño de poro de 0,22 μm y recoger el filtrado, en el que dicho filtrado proporciona una composición que comprende dicho polipéptido.

30 Como alternativa, en una segunda realización, la composición para uso en los métodos de la invención puede obtenerse o ser obtenible por un método que comprende al menos las etapas de:

- a') suspender huevos de peces en un volumen mínimo de agua, preferentemente huevos de salmón;
 35 b') inducir la eclosión rápida, sincronizada, de dichos huevos, preferentemente de modo que la eclosión se complete en menos de 2 horas para más del 95 % de los embriones;
 c') filtrar los huevos eclosionados para obtener el líquido de incubación; y
 d') filtrar el líquido de incubación para obtener la composición, en el que la etapa de filtración del líquido de incubación comprende al menos las etapas de:
 40 (i) filtrar el líquido de incubación usando un filtro con un tamaño de poro de al menos 5 μm , preferentemente 5-15 μm , y particularmente preferentemente un tamaño de poro de 7 μm , y recoger el filtrado;
 (ii) someter el filtrado de la etapa (i) a cromatografía de intercambio iónico y recoger el eluato;
 45 (iii) intercambiar el agua en el eluato de la etapa (ii) con un tampón farmacéuticamente aceptable; y
 (iv) filtrar la solución obtenida de la etapa (iii) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 μm , preferentemente un tamaño de poro de 0,22 μm y recoger el filtrado, en el que dicho filtrado proporciona una composición que comprende dicho polipéptido o parte del mismo.

50 En algunas realizaciones puede ser beneficioso para el sujeto someter el filtrado de la etapa (i) a una etapa de filtración adicional usando un filtro con un tamaño de poro que es menor que la primera etapa de filtración. Esto puede ayudar a evitar que el material del líquido de incubación obstruya la columna de intercambio iónico (es decir inhiba el flujo de líquido a través de la columna de intercambio iónico). Por lo tanto, la etapa de filtración del líquido de incubación puede comprender una etapa opcional de:

- 55 (i') filtrar el filtrado de la etapa (i) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,30-0,60 μm , preferentemente un tamaño de poro de 0,35-0,55, particularmente preferentemente 0,40-0,50 μm , más preferentemente 0,45 μm y recoger el filtrado.

60 Preferentemente la etapa de filtración opcional se realiza antes de la etapa de someter el filtrado de (i) a cromatografía de intercambio iónico. Por lo tanto, el filtrado sometido a cromatografía de intercambio iónico puede ser de la etapa (i) o etapa (i').

En una realización ejemplar la etapa (ii) comprende:

- 65 (a) Cargar el filtrado (de la etapa (i) o etapa (i')) en una columna de intercambio iónico, tal como una columna de DEAE (dietilaminoetilo);

- (b) lavar la columna con un tampón adecuado, por ejemplo una solución de lavado que comprende Tris-HCl 20 mM, pH 8,5;
- (c) eluir el polipéptido de la columna usando un tampón de elución o disolvente, tal como la solución de lavado que comprende además una sal, por ejemplo NaCl 50 mM; y
- (d) recoger el eluato de la etapa (c).

Por lo tanto un método general de filtración de líquido de incubación puede comprender las etapas (i) de los métodos anteriores; la etapa (ii) del primer método anterior usando un filtro con un tamaño de poro de 0,30-0,60 μm y/o la etapa (ii) del segundo método anterior usando cromatografía de intercambio iónico; la etapa (iii) de los métodos anteriores; opcionalmente la etapa (iv) del primer método anterior usando un filtro con un tamaño de exclusión de al menos 80 kDa y la etapa (v) del primer método anterior (el equivalente de la etapa (iv) del segundo método anterior) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 μm .

Aunque el filtrado puede en sí mismo formar la composición cosmética, opcionalmente el producto (el filtrado de la etapa (v) de la primera realización o la etapa (iv) de la segunda realización) obtenido u obtenible a partir de los métodos anteriores puede diluirse (o concentrarse) a una concentración apropiada antes de su uso en los métodos de la invención. Por lo tanto, los métodos pueden comprender una etapa adicional de dilución (o concentración) de la composición. Preferentemente el filtrado puede diluirse (o concentrarse) en un factor de al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 1000, 5000 o 10000.

Opcionalmente, uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables pueden añadirse al producto obtenido u obtenible a partir de los métodos anteriores. Por lo tanto, los métodos pueden comprender una etapa adicional de añadir uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables a la composición o combinar la composición con uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las etapas del método de preparación alternativas o adicionales incluyen cambiar o modificar el disolvente, por ejemplo pH, concentración iónica, etc.

Otros componentes o ingredientes farmacéuticamente aceptables pueden añadirse al producto obtenido u obtenible a partir de los métodos anteriores. El o los componentes adicionales pueden ser componentes activos, es decir componentes que tienen un efecto en la piel, preferentemente que también actúan para promover la apariencia estética de la piel o mejoran la apariencia cosmética de la piel, por ejemplo en las indicaciones cosméticas descritas en el presente documento. Por lo tanto, como alternativa o adicionalmente, los métodos pueden comprender una etapa adicional de añadir uno o más componentes activos farmacéuticamente aceptables a la composición o combinar la composición con uno o más componentes activos farmacéuticamente aceptables. Los componentes activos farmacéuticamente aceptables pueden incluir minerales, vitaminas, enzimas, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, antioxidantes, polisacáridos, sustancias adecuadas como filtros protectores solares, exfoliantes químicos, extractos y mezclas de los mismos, como se describe en más detalle posteriormente.

El polipéptido aislado y/o la composición cosmética obtenida u obtenible a partir de los métodos anteriores es adecuado para su uso en los métodos de la invención, como se describe en otra parte del presente documento. Por lo tanto, en una realización la invención proporciona una composición cosmética que puede obtenerse a partir de los métodos descritos anteriormente que comprenden adicionalmente la etapa de preparar dicha composición cosmética a partir del filtrado de la etapa (v) o (iv') en la que el polipéptido o parte del mismo está presente en el intervalo de 30-50 % p/p de la masa seca de la composición. En particular, la composición cosmética es para su uso en la mejora de la apariencia cosmética de la piel en un animal mamífero.

La etapa de someter el filtrado a cromatografía de intercambio iónico puede realizarse usando cualquier método adecuado que dé como resultado un filtrado en el que los polipéptidos desvelados en el presente documento (incluyendo partes de los mismos como se ha definido anteriormente) están enriquecidos en relación con al menos otros de los polipéptidos presentes en el extracto de líquido de incubación antes de la purificación (es decir antes de la cromatografía de intercambio iónico). Por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico puede dar como resultado un eluato en el que los polipéptidos desvelados en el presente documento están enriquecidos en al menos 5 % en relación con al menos uno de los otros polipéptidos, preferentemente todos los otros polipéptidos, presentes en el extracto de líquido de incubación antes de esta etapa de purificación. Otros polipéptidos pueden definirse como polipéptidos que no quedan dentro de la definición estructural y/o funcional de un polipéptido para su uso en los métodos de la invención (es decir una leucolectina) como se ha definido anteriormente. Preferentemente, los polipéptidos son enriquecidos en al menos 10, 20, 30, 40 o 50 % por esta etapa. Especialmente preferentemente el polipéptido se purifica hasta un grado de pureza de más del 50 o 60 %, por ejemplo >70, 80 o 90 %, preferentemente más de 95 o 99 % de pureza en relación con al menos uno de los otros polipéptidos presentes en el extracto de líquido de incubación antes de la purificación. Por lo tanto, el eluato puede comprender solamente cantidades traza de otros polipéptidos que están presentes en el líquido de incubación antes de la cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo menos de 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, 0,0001 % o 0,00001 % p/p.

La cromatografía de intercambio iónico se conoce bien en la técnica y están disponibles en el mercado columnas de intercambio iónico adecuadas. En una realización ejemplar la columna de intercambio iónico es una columna de DEAE (dietilaminoetilo), es decir una columna de una matriz inerte, tal como celulosa, sílice, sepharose etc. que se

ha acoplado a DEAE. Sin embargo, otras columnas de intercambio iónico pueden ser adecuadas para su uso en el método descrito anteriormente.

La etapa de cargar el líquido de incubación filtrado en la columna de intercambio iónico comprende aplicar el líquido de incubación a una columna de intercambio iónico que se ha preparado o activado de modo que sea capaz de unirse con los polipéptidos desvelados en el presente documento. La preparación o activación de la columna de intercambio iónico típicamente implica lavar la columna con un tampón, por ejemplo el tampón de lavado como se define posteriormente. Esta etapa de prelavado da como resultado una columna de intercambio iónico que está en condiciones óptimas, por ejemplo pH, para permitir que los polipéptidos se unan con la columna. Por lo tanto, la etapa de carga puede verse como una etapa de unión de los polipéptidos desvelados en el presente documento con una columna de intercambio iónico.

Después de la etapa de cargar el líquido de incubación filtrado en la columna de intercambio iónico y de acuerdo con los protocolos convencionales, la columna puede lavarse con un tampón adecuado para retirar componentes indeseados presentes en el líquido de incubación que no están unidos a la columna. El lavado comprende aplicar un volumen de tampón de lavado a la columna, típicamente el volumen de tampón de lavado aplicado a la columna es al menos igual al volumen de la columna de intercambio iónico y puede ser más, por ejemplo al menos 1,5, 2, 3, 4 o 5 veces el volumen de la columna. En algunas realizaciones, la etapa de lavado puede repetirse, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o más veces. Puede utilizarse cualquier tampón de lavado adecuado en el método desvelado en el presente documento. Un tampón de lavado adecuado es uno que no altera significativamente la interacción entre los polipéptidos de interés y la columna de intercambio iónico, por ejemplo menos de 10 %, por ejemplo menos de 5, 4, 3, 2 o 1 %, de los polipéptidos desvelados en el presente documento se retiran de la columna de intercambio iónico por cada etapa de lavado. En una realización preferida el tampón de lavado es una solución de Tris-HCl en el intervalo de 10-100 mM, preferentemente 10-50 mM, por ejemplo 20-30 mM, con un pH en el intervalo de 6-10, preferentemente 7-9, por ejemplo 8,5. El flujo continuo de la etapa de lavado puede recogerse, por ejemplo para determinar si se requieren etapas de lavado adicionales (por ejemplo se ensayan con respecto a la presencia de polipéptidos, polisacáridos, sales etc. que representan componentes no deseados presentes en el líquido de incubación antes de la purificación) y/o se descartan.

La etapa de elución del polipéptido de la columna de intercambio iónico puede realizarse por cualquier medio adecuado y típicamente implica la aplicación de un disolvente o una solución a la columna para romper la interacción entre el polipéptido de interés y la columna de intercambio iónico. Típicamente el volumen de tampón de elución o disolvente aplicado a la columna es al menos igual al volumen de la columna de intercambio iónico y puede ser más, por ejemplo al menos 1,5, 2, 3, 4 o 5 veces el volumen de la columna. En algunas realizaciones la etapa de elución puede repetirse, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o más veces. El eluato (el flujo continuo de la etapa de elución) puede recogerse de cada etapa de elución y pueden combinarse uno o más de los eluatos antes de la etapa de intercambio del agua en el eluato. Un tampón de elución o disolvente adecuado es uno que rompe la interacción entre los polipéptidos de la invención y la columna de intercambio iónico, por ejemplo al menos 70 %, preferentemente al menos 75, 80, 85, 90, 95 o 99 %, de los polipéptidos desvelados en el presente documento unidos a la columna se eluyen de la columna por cada etapa de elución.

En una realización preferida el tampón de elución es el mismo que el tampón de lavado que también comprende una sustancia capaz de romper la interacción entre los polipéptidos y la columna de intercambio iónico, por ejemplo una sal. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el tampón de elución es una solución de Tris-HCl en el intervalo de 10-100 mM, preferentemente 10-50 mM, por ejemplo 20-30 mM, con un pH en el intervalo de 6-10, preferentemente 7-9, por ejemplo 8,5 que también comprende una sal, por ejemplo NaCl, KCl etc. en el intervalo de 10-500 mM, preferentemente 20-400 mM, 30-300 mM, 40-200 mM o 50-100 mM, por ejemplo NaCl 50 mM.

La etapa de intercambio del agua en el filtrado o eluato puede realizarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo diafiltración o diálisis. En una realización particularmente preferida, esta etapa se realiza usando diafiltración usando un filtro con un tamaño de exclusión de menos de 15 kDa, preferentemente 10 kDa o menos, por ejemplo 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 kDa o menos.

La diafiltración usa membranas de ultrafiltración para retirar por ejemplo sales u otros microsolutos no deseados o no deseables de una solución o como un modo de intercambiar el disolvente, por ejemplo tampón, de una solución. Se separan moléculas pequeñas de una solución mientras que se conservan moléculas mayores en la fracción retenida (el material que no pasa a través del filtro). Los microsolutos y disolventes, por ejemplo agua, se lavan en general fácilmente a través de la membrana. Típicamente, aproximadamente 3 volúmenes de disolvente de diafiltración eliminarán el 95 % del microsolutos. Por lo tanto, el filtrado anterior de la etapa (ii) del primer método descrito anteriormente o el eluato de la etapa (ii) del segundo método descrito anteriormente se procesa inicialmente por diafiltración y esto da como resultado la concentración de la fracción retenida a medida que una proporción de la solución (que contiene las impurezas solubles/fracción no deseada del líquido de incubación) pasa a través de la membrana. La fracción retenida se diluye después con un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo fosfato sódico 0,5 mM y cloruro sódico 1 mM, solución salina tamponada con fosfato, etc. La fracción retenida diluida puede someterse a ciclos repetidos de diafiltración, si es necesario.

Puede conseguirse eclosión sincronizada por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, los huevos pueden sincronizarse usando fotomanipulación, por ejemplo transferencia de huevos de la luz (que inhibe la eclosión) a condiciones sin luz. También puede usarse manipulación de la temperatura de la solución, por desoxigenación (Oppen-Berntsen *et al.*, 1990, Aquaculture, 86, pp. 417-430) y estimulación usando electricidad para provocar la eclosión sincronizada. Como se ha indicado anteriormente, un volumen mínimo de agua puede ser equivalente al volumen de huevos o menos, por ejemplo para cada 1 ml de huevos puede usarse un líquido de suspensión de ≤ 1 , 0,75, 0,5, 0,25 ml, por ejemplo de 0,5 a 1 ml.

Cuando el polipéptido como se describe en el presente documento se obtiene de leucocitos este se obtiene en forma no modificada. Los polipéptidos obtenidos del líquido de incubación de *Salmonidae*, por ejemplo salmón, se modifican (por glucosilación y/o fosforilación), pero ambas formas son igualmente eficaces en los métodos descritos en el presente documento.

Los polipéptidos descritos en el presente documento están preferentemente sustancialmente libres de cualquier componente contaminante derivado del material o los materiales fuente usados en el procedimiento de aislamiento o en su preparación. Especialmente preferentemente el compuesto se purifica hasta un grado de pureza de más de 50 o 60 %, por ejemplo > 70, 80 o 90 %, preferentemente más de 95 o 99 % de pureza como se evalúa p/p (peso seco).

Dichos niveles de pureza corresponden a la molécula específica de interés, pero incluyen sus productos de degradación. Cuando sea apropiado, pueden usarse preparaciones enriquecidas que tienen menor pureza, por ejemplo contienen más de 1, 2, 5 o 10 % de la molécula de interés, por ejemplo más de 20, 30 o 40 % como se evalúa p/p (peso seco). El método de "aislar" un polipéptido como se ha descrito anteriormente se refiere a aislamiento hasta una pureza como se ha descrito anteriormente. Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo HPLC, exclusión por tamaño, intercambio iónico, afinidad, interacción hidrófoba, fase inversa) o electroforesis capilar.

Los polipéptidos o composiciones como se describen en el presente documento pueden usarse *in vitro*, por ejemplo en cultivo de células u órganos, para afectar a las propiedades de dichas células, por ejemplo para inhibir la liberación de MMP de modo que se altere la estructura y/o composición de las proteínas de la matriz extracelular.

Sin embargo, los polipéptidos y las composiciones se prefieren para uso *in vivo* como se analiza en el presente documento.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "fisiológicamente aceptable" se entiende que el ingrediente debe ser adecuado para aplicaciones y composiciones cosméticas. El ingrediente también debe ser compatible con otros ingredientes en la composición así como fisiológicamente aceptable para el receptor.

El principio activo para administración puede modificarse apropiadamente para su uso en una composición cosmética. Por ejemplo los compuestos usados de acuerdo con la invención pueden estabilizarse contra la degradación mediante el uso de derivados como se ha descrito anteriormente.

El principio activo también puede estabilizarse en las composiciones por ejemplo mediante el uso de aditivos apropiados tales como sales o no electrolitos, acetato, SDS, EDTA, tampones de citrato o acetato, manitol, glicina, HSA o polisorbato.

El polipéptido o la composición como se describen en el presente documento pueden estar presentes en dichas composiciones como el único principio activo o pueden combinarse con otros ingredientes, particularmente otros principios activos, por ejemplo para aumentar el efecto cosmético (como se ha descrito anteriormente) o para hacer la composición más atractiva para el consumidor.

Como se ha mencionado anteriormente, los polipéptidos y composiciones como se describen en el presente documento muestran propiedades que son útiles en la mejora de la apariencia cosmética de la piel, particularmente de piel envejecida, por ejemplo, piel fotoenvejecida o piel cicatricial, por ejemplo como resultado de daño de al menos una capa de la piel, por ejemplo una herida, o imperfecciones o abrasiones resultantes de daño menor a la epidermis y/o dermis.

La composición que comprende uno o más polipéptidos descritos en el presente documento también puede comprender impurezas, por ejemplo después de la preparación de dichos uno o más polipéptidos descritos en el presente documento a partir de fuentes naturales. En composiciones que comprenden dichos uno o más polipéptidos como se describe en el presente documento, cada uno de dicho o dichos polipéptidos puede estar presente en el intervalo de 0,0001 a 50 % p/p de la composición cosmética preparada de acuerdo con el método descrito anteriormente. Preferentemente dicho polipéptido o dichos polipéptidos están presentes en un intervalo de 0,01-40 % p/p de la composición cosmética preparada de acuerdo con el método anterior o como se describe posteriormente en el presente documento, por ejemplo después de dilución adicional. Por ejemplo, el polipéptido o los polipéptidos pueden estar presentes en un intervalo de 0,0001 a 5 %, 0,0001 a 3 %, 0,0001 a 2 %, 0,0001 a 1 %, 0,0001 a 0,5 %, 0,0001 a 0,1 % p/p de la composición cosmética.

La proporción del polipéptido o los polipéptidos o partes del polipéptido o los polipéptidos presentes en las composiciones cosméticas puede definirse en relación con los otros solutos (por ejemplo sales) en la composición, es decir excluyendo disolventes, por ejemplo agua. Por lo tanto, dicho polipéptido o dichos polipéptidos o partes del polipéptido o polipéptidos pueden estar presente en el intervalo de 10-100 % p/p de la masa seca de la composición.

En algunas realizaciones los polipéptidos o partes de polipéptidos, en combinación, pueden estar presentes en el intervalo de 10-90 % p/p de la masa seca de la composición, por ejemplo 10-80 %, 15-70 %, 20-60 %, 30-50 % p/p de la masa seca de la composición. En otras realizaciones los polipéptidos o partes de polipéptidos, en combinación, pueden estar presentes en el intervalo de 10-40 %, 20-39 %, 25-38 %, 30-37 % etc. p/p de la masa seca de la composición. Como se describe en el presente documento la composición puede diluirse para su uso en los métodos de la invención.

La invención se dirige a métodos para mejorar la apariencia cosmética de piel envejecida o cicatricial, y en todos los casos el tratamiento es de naturaleza cosmética.

Como se indica en el presente documento se entiende que "cosmético" se refiere a un tratamiento que no cura, trata o previene una enfermedad o un trastorno, sino que en su lugar actúa como un producto de cuidado de la piel o para modificar o mejorar la apariencia de la piel, por ejemplo el color, la textura o el contenido de humedad de la piel.

La base de los tratamientos descritos en el presente documento es los efectos antienviejecimiento de la piel, reductores de cicatrices y antiimperfecciones/antiabrasión de los polipéptidos como se desvela en el presente documento. Estos efectos se han mostrado en los ejemplos proporcionados en el presente documento.

Se controlan por lo tanto tratamientos basados en las propiedades antienviejecimiento y reductoras de cicatrices de los polipéptidos descritos en el presente documento.

La invención proporciona por lo tanto un método cosmético para mejorar la apariencia de piel envejecida o cicatrizada de un animal mamífero, en el que un polipéptido o una composición cosmética como se ha descrito anteriormente en el presente documento se administra a dicho animal.

"Piel envejecida" se refiere a piel que presenta una o más señales o síntomas de envejecimiento, es decir la aparición de arrugas, líneas finas, hiperpigmentación, laxitud (flacidez), piel seca, descamación o pérdida de agua transepidérmica (PATE). En particular, la "piel envejecida" se determina en relación con piel óptima normal, es decir piel sana, hidratada, de pigmentación normal y no envejecida. A este respecto, la piel envejecida puede no estar relacionada con la edad del sujeto y puede haber envejecido prematuramente, por ejemplo mediante exposición crónica a luz del sol (daño solar). Por lo tanto, los parámetros relativos para "piel óptima normal" pueden determinarse como las mediciones promedio de las señales anteriores de envejecimiento a partir de varios sujetos de la misma edad o una edad similar al sujeto en cuestión, por ejemplo sujetos que no han recibido exposición crónica a la luz solar. Como alternativa, los parámetros relativos para "piel óptima normal" pueden tomarse como las mediciones de sujetos que son más jóvenes que el sujeto en cuestión. En otras palabras, los métodos y composiciones como se describen en el presente documento pueden usarse para restaurar la apariencia juvenil de la piel, en relación con la piel del sujeto a una edad más temprana.

En una realización particularmente preferida, la mejora de la apariencia cosmética de la piel envejecida (por ejemplo, piel dañada por el sol) implica una reducción o prevención de la apariencia cosmética o prevalencia de arrugas, líneas finas, hiperpigmentación, laxitud, piel seca, descamación y/o pérdida de agua transepidérmica. Uno o más de estos parámetros pueden mejorarse. Preferentemente se reducen las líneas finas y/o las arrugas.

La reducción o prevención en la apariencia cosmética o prevalencia de las señales o síntomas de piel envejecida puede significar que hay una reducción del número y/o gravedad de la señal o del síntoma. Por ejemplo, puede reducirse el número de líneas finas y arrugas y/o puede reducirse o minimizarse el tamaño, por ejemplo la profundidad, de las arrugas o líneas finas. Además, la reducción o prevención puede implicar detener, reducir la tasa de, la aparición de nuevas señales o síntomas.

La "piel seca", como se indica en el presente documento se refiere a una epidermis que carece de humedad o sebo, con frecuencia caracterizada por un patrón de líneas finas, descamación y una sensación de prurito y/o quemazón. La piel seca puede aparecer como una condición cutánea en sí misma (por ejemplo debido a la edad) o puede ser el síntoma de un trastorno o una afección cutánea tal como daño por el sol.

A este respecto, la reducción de la piel seca, descamación, líneas finas o pérdida de agua transepidérmica puede conseguirse por los efectos hidratantes del polipéptido y la composición descritos anteriormente.

Por lo tanto, un método cosmético para hidratar piel envejecida o cicatrizada de un animal mamífero se desvela en el presente documento, en el que se administra un polipéptido o una composición cosmética como se define en el presente documento a dicho animal.

“Hidratar” como se indica en el presente documento abarca hidratantes que evitan la pérdida de agua de la piel (por ejemplo, PATE) así como hidratantes (humectantes) que atraen y conservan agua cuando se aplican a la piel y emolientes (que mejoran la descamación defectuosa).

5 Como se ha mencionado anteriormente, dichas propiedades hidratantes son ventajosas para mejorar la apariencia cosmética de la piel. En realizaciones particularmente preferidas, la piel es la piel de la cara, orejas, cuello, manos o cuero cabelludo.

10 Las “arrugas” son pliegues, bordes o surcos en la piel. Las arrugas cutáneas típicamente aparecen como resultado de procesos de envejecimiento. A este respecto, la dermis comprende muchos de los elementos estructurales de la piel, que incluyen colágeno, que proporcionan a la piel su fuerza, glucosaminoglucanos que proporcionan a la piel su turgencia, y fibras de elastina que proporcionan a la piel su elasticidad o vigor.

15 A medida que la piel envejece, la capa dérmica se hace más fina y la piel también produce menos colágeno. Además, las fibras de elastina que proporcionan elasticidad se desgastan. Estos cambios en el almacén de la piel provocan que la piel se arrugue y cuelgue. Las crestas de rete de la unión dérmica-epidérmica se aplanan, haciendo a la piel más frágil y haciendo más fácil que la piel se corte. Este proceso también reduce la cantidad de nutrientes disponibles para la epidermis reduciendo el área superficie en contacto con la dermis, interfiriendo también con el proceso de reparación normal de la piel.

20 En la capa subcutánea las células grasas se hacen más pequeñas con la edad. Esto conduce a arrugas y flacidez (laxitud) más notables, ya que las células grasas no pueden “rellenar” el daño de las otras capas.

25 La exposición a radiación UVA y UVB, es decir luz solar, provoca que el colágeno se degrade a una mayor velocidad que solamente con el envejecimiento cronológico. La luz solar daña las fibras de colágeno y provoca la acumulación de elastina anómala. Cuando esta elastina inducida por el sol se acumula, se producen metaloproteinasas de la matriz (MMP) en grandes cantidades. Normalmente, las metaloproteinasas remodelan la piel lesionada por el sol fabricando y reformando colágeno. Sin embargo, este proceso no siempre funciona bien y algunas de las metaloproteinasas de hecho degradan el colágeno. Esto da como resultado la formación de fibras de colágeno desorganizadas conocidas como cicatrices solares. La repetición de este proceso de regeneración/reconstrucción imperfecto provoca que se desarrollen arrugas y laxitud de la piel.

35 Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, se ha mostrado que los polipéptidos como se describen en el presente documento inhiben la liberación de MMP, por lo tanto los polipéptidos y composiciones desvelados en el presente documento son ventajosos para reducir o prevenir la formación de arrugas y laxitud de la piel.

40 Pueden producirse trastornos de pigmentación o anomalías de la piel, es decir hiperpigmentación, como resultado de la edad o pueden resultar de envejecimiento prematuro debido, por ejemplo, a daño por el sol. La pigmentación alterada puede resultar de un exceso local de melanocitos o aumentos de la actividad de melanocitos, o ambos. Los trastornos de pigmentación incluyen manchas hepáticas, solares o de la edad (lentigo solar) y otras imperfecciones tales como pecas.

45 La “piel cicatrizada” es piel que es funcional y cosméticamente inferior a la piel no lesionada normal. Como se ha mencionado anteriormente, se cree que la cicatrización resulta de la disposición diferente de haces de colágenos que se forman en la piel que se está curando.

50 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es la provisión de un método cosmético para mejorar la apariencia cosmética de una cicatriz en un animal mamífero en el que un polipéptido o una composición cosmética como se ha descrito anteriormente en el presente documento se administra a dicho animal, preferentemente en el que dicho polipéptido o composición se administra por vía tópica a tejido cicatricial.

Existen diversos estadios de la curación de la piel (descritos en el documento WO 2007/059584), por ejemplo heridas, que dan como resultado una cicatriz o tejido cicatricial.

55 El primer estadio es el estadio “inflamatorio” (0-6 días), que se produce inmediatamente después de producirse la herida, tal como una herida cutánea. Esto se denomina hemostasia, por la que se inician la vasoconstricción y la coagulación, mediada por fibrina y plaquetas, para controlar la hemorragia. El coágulo sirve además como una matriz provisional para fibroblastos entrantes y células inflamatorias a la herida y como un depósito de citocinas y factores de crecimiento.

60 Después de la hemostasia, las células inflamatorias entran en la herida y perpetúan el proceso inflamatorio (manifestado por eritema, calor, hinchazón y dolor). Las primeras de estas son células polimorfonucleares (PMN) que son atraídas por factores de crecimiento y citocinas tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) e IL-8. IL-8 es un quimioatrayente importante para PMN, y su expresión rápida y transitoria es crítica para el proceso inflamatorio. Las PMN comienzan a limpiar la herida retirando restos celulares, partículas ajenas y bacterias y son residentes en la herida durante un periodo relativamente corto (1-2 días). Aproximadamente a los 3 días

después de la lesión, las PMN son reemplazadas por monocitos, que se transforman en macrófagos que también actúan como limpiadores de heridas. Los fibrocitos desempeñan un papel importante en el proceso inflamatorio y están implicados específicamente en la producción de colágeno y citocinas.

El segundo estadio es el estadio de "Proliferación" (que se produce de 3 días a varias semanas después del daño cutáneo). Los fibroblastos migratorios producen una matriz extracelular (ECM) basada en colágeno permanente y los macrófagos producen una diversidad de factores de crecimiento y citocinas, que a su vez estimulan la producción de factores de crecimiento. Las metaloproteinasas de la matriz y serina proteasas desempeñan un papel importante en la regulación de la migración celular y la remodelación de ECM después de lesión y se ha demostrado que la reorganización de ECM reducida se asocia con producción y activación de MMP de fibroblastos reducida.

La reepitelización es el siguiente acontecimiento clave en el proceso de curación de la piel y se inicia principalmente por queratinocitos migratorios. Se consigue reepitelización mediante proliferación de queratinocitos estimulada por factor de crecimiento y citocinas, que migran a través del tejido de granulación. Estas células parecen experimentar varios cambios fenotípicos durante la migración, expresando proteínas asociadas con el fenotipo celular diferenciador. A medida que se produce la migración, los queratinocitos adquieren un fenotipo proteolítico que produce serina proteinasas y MMP. Los queratinocitos continúan migrando al espacio de herida hasta su compleción, cuando los queratinocitos mitóticamente activos experimentan alteración fenotípica adicional, de modo que se produce diferenciación y estratificación del epitelio y reformación de la membrana basal, para completar el proceso de reepitelización.

La unión de ECM celular, degradación de ECM por proteinasas y la regulación general de estos procesos por citocinas y factores de crecimiento son otros elementos claves de la remodelación y la curación de la piel, que coordinan la función celular, tal como migración celular y contracción de heridas, mediante interacciones de integrina celular-ECM. Dichas interacciones regulan la reorganización del citoesqueleto y nuevas interacciones integrina-ECM, mientras que las proteinasas retiran las interacciones de integrina existentes, permitiendo la desadhesión posterior y migración celular. La contractilidad celular en ausencia de desadhesión posterior da como resultado reorganización dérmica, como se cuantifica experimentalmente por reorganización/contracción de la red de colágeno.

El estadio final de la curación de heridas (y por lo tanto la formación de cicatriz) es la "maduración" (que tiene lugar entre 4 días-semanas o meses después de haberse producido el daño). La maduración (o remodelación) puede tardar tan poco como días o semanas, particularmente para daño de piel superficial, pero el proceso completo puede durar hasta varios años. Durante esta fase se observa contracción, reducción de la rojez, reducción del grosor, reducción de la induración y aumento de la fuerza de la piel. La piel o el tejido cicatricial se contraen bajo la influencia de los miofibroblastos, se reduce la producción de colágeno en el tejido de granulación y se disminuyen los vasos sanguíneos. La curación de la piel se completa después por reepitelización adicional.

Por lo tanto, resultará evidente a partir de lo anterior que el polipéptido o la composición descrita en el presente documento puede tener un efecto en la mejora de la apariencia cosmética de una cicatriz cuando se aplica durante el proceso de curación de la piel, particularmente en el estadio de proliferación o maduración. Por lo tanto, los productos descritos anteriormente pueden aplicarse a cicatrices, en las que una cicatriz puede verse como piel parcial o completamente curada. En una realización preferida, el polipéptido o composición como se describe en el presente documento es para aplicación en el estadio de maduración.

En una realización particularmente preferida, el tejido cicatricial es un resultado de acné.

En otra realización preferida el tejido cicatricial es una estría. Preferentemente la estría se selecciona de una cualquiera de *striae atrophicae*, *striae vergetures*, *striae distensae*, *striae cutis distensae*, *striae gravidarum*, *lineae atrophicae* o *linea albicante*.

Como se indica en el presente documento la "mejora" de la apariencia cosmética de la piel se determina en relación con piel óptima normal, es decir, piel sana, hidratada, con pigmentación normal y no envejecida. Por lo tanto, con respecto a la piel envejecida, pueden medirse una o más de las señales o los síntomas del envejecimiento como se describe en los Ejemplos y compararse con las mismas señales de la piel que es cronológica o fisiológicamente más joven, preferentemente cuando una mejora es la reducción de una o más de las señales o síntomas del envejecimiento.

Con respecto a la piel cicatrizada, la mejora de la apariencia cosmética de una cicatriz significa que el área de la cicatriz puede mostrar una reducción en el nivel o extensión de la cicatrización, rojez, marcas cutáneas o pigmentación (hiper o hipopigmentación) que podrían asociarse de otro modo con el proceso de curación de heridas, en el que estos atributos se comparan con piel normal, no cicatricial. La fuerza tensil de la piel en y alrededor del sitio de la piel curada o cicatriz también puede medirse, indicando un aumento en la fuerza tensil una mejora en la apariencia cosmética de la piel.

En un aspecto preferido los usos cosméticos se consiguen por administración tópica a la piel.

Como se usa en el presente documento, el “tratamiento” se refiere a la reducción, el alivio o la eliminación, preferentemente hasta niveles normales, de uno o más de los síntomas cosméticos o efectos de dicha condición o trastorno cosmético, por ejemplo la presencia o alcance de piel seca, extensión o área de pigmentación o cicatriz etc. en relación con los síntomas o efectos presentes en una parte diferente del cuerpo de dicho individuo donde la piel no padece dicha afección o trastorno y no se somete a dicho tratamiento o en un individuo normal correspondiente no sujeto a dicho tratamiento.

“Prevenir” o “reducir” se refieren a la prevención absoluta, o reducción o alivio del alcance o momento (por ejemplo retardo) de la aparición de ese síntoma o efecto. Por ejemplo las condiciones tipificadas por piel seca, con pigmentación anómala, arrugada o cicatrizada pueden prevenirse mediante la aplicación regular de composiciones descritas en el presente documento antes de la aparición de dicha afección.

Preferentemente dichos tratamientos se consiguen usando los polipéptidos descritos en el presente documento. Se prefieren particularmente composiciones cosméticas que comprendan dichos polipéptidos.

Los métodos cosméticos de tratamiento o prevención de acuerdo con la invención pueden combinarse provechosamente con la administración de uno o más principios activos que son eficaces en el tratamiento o la prevención de los trastornos o afecciones y/o para conseguir, por ejemplo, hidratación. Por lo tanto, las composiciones cosméticas descritas en el presente documento pueden contener adicionalmente uno o más de dichos principios activos.

Se desvelan en el presente documento productos que contienen uno o más polipéptidos como se definen en el presente documento y opcionalmente uno o más principios activos adicionales como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia humana o de animal mamífero como se describe en el presente documento.

Las composiciones de la invención y para uso en los métodos de la invención pueden formularse de una manera convencional con uno o más vehículos, excipientes y/o diluyentes fisiológicamente aceptables, de acuerdo con técnicas bien conocidas en este campo usando ingredientes fácilmente disponibles.

Por lo tanto, el principio activo puede incorporarse, opcionalmente junto con otras sustancias activas como una preparación combinada, con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes convencionales, para producir preparaciones galénicas convencionales tales como polvos, bolsitas, obleas, elixires, suspensiones (como líquidos de infusión), emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas, polvos envasados estériles y similares. Las composiciones pueden estabilizarse mediante el uso de liofilización, subenfriamiento o Permazyme.

Son excipientes, vehículos o diluyentes adecuados lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato cálcico, carbonato cálcico, lactosa cálcica, almidón de maíz, aglinatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, agua, agua/etanol, agua/glicol, agua/polietileno, glicol, propilenglicol, metil celulosa, metil hidroxibenzoatos, propil hidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio, aceite mineral o sustancias grasas tales como grasa dura o mezclas adecuadas de los mismos. También pueden usarse agentes para obtener formulaciones de liberación sostenida, tales como carboxipolimetileno, carboximetilcelulosa, acetato ftalato de celulosa o polivinilacetato.

Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de aumento de la viscosidad, agentes granulantes, agentes disgregantes, agentes de unión, agentes activos osmóticos, agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes saporíferos, potenciadores de la adsorción (por ejemplo agentes penetradores en superficie, por ejemplo sales biliares, lecitinas, tensioactivos, ácidos grasos, quelantes), agentes de oscurecimiento, disolvente orgánico, antioxidante, agentes estabilizantes, emolientes, silicona, alfa hidroxiaácido, demulcente, agente antiespumante, agente hidratante, vitamina, fragancia, espesantes iónicos o no iónicos, tensioactivos, cargas, espesantes iónicos o no iónicos, secuestrante, polímero, propulsor, agente alcalinizante o acidificante, opacificante, agentes colorantes y compuestos grasos y similares. Algunos de estos componentes se describen en más detalle posteriormente.

Otros principios activos o componentes en la composición cosmética pueden seleccionarse de uno o más cualesquiera de minerales, vitaminas, enzimas, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, polisacáridos, sustancias adecuadas como filtros solares, exfoliantes químicos, extractos, agentes acondicionantes de la piel, antioxidantes y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de proteínas que pueden combinarse con la composición de la invención incluyen colágeno y/o un derivado del mismo (por ejemplo partes del mismo como se ha definido anteriormente), una proteína o un péptido que es capaz de promover el crecimiento celular, glucoproteína 1, glucoproteína 2 y laminina.

La composición de la invención puede combinarse con enzimas que incluyen, pero sin limitación, una cualquiera o más de enzimas de frutas (por ejemplo bromelaína), superóxido dismutasa, peroxidasa, hialuronidasa y mucopolisacaridasa.

- 5 Los péptidos pueden seleccionarse, pero sin limitación, de uno cualquiera o más de D,L-carnosina, D-carnosina, L-carnosina, anserina y Matrixilo (derivado de pentapéptido).

- 10 Los aminoácidos pueden seleccionarse de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-cistina, glicina, L-glutamina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina y derivados de los mismos incluyendo aminoácidos de origen no natural como se define en la Tabla 1. Pueden seleccionarse aminoácidos particularmente preferidos como antioxidantes de uno cualquiera o más de glicina, lisina, arginina, cisteína, cistina, histidina, tirosina y triptófano.

- 15 La composición cosmética puede comprender uno o más lípidos que incluye grasas, aceites, ceras y similares. Son aceites polares adecuados, por ejemplo, los del grupo de lecitinas y triglicéridos de ácidos grasos, concretamente los triglicéridos ésteres de ácidos alcanocarboxílicos saturados y/o insaturados, ramificados y/o no ramificados con una longitud de cadena de 8 a 24, en particular 12 a 18, átomos de carbono. Los triglicéridos de ácidos grasos pueden elegirse, por ejemplo, provechosamente del grupo de aceites sintéticos, semisintéticos y naturales, tales como, por
20 ejemplo, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de almendra, aceite de palma, aceite de coco, aceite de ricino, aceite de germen de trigo, aceite de semilla de uva, aceite de cardo, aceite de onagra, aceite de macadamia y similares.

- 25 Como alternativa o adicionalmente el aceite puede seleccionarse de aceites volátiles, aceites no volátiles o mezclas de los mismos. Los aceites no volátiles incluyen aceites que cumplen al menos una de las siguientes definiciones: (a) el aceite muestra una presión de vapor de no más de 26,6 Pa a 25 °C y una atmósfera de presión; (b) el aceite tiene un punto de ebullición a una atmósfera de al menos 300 °C. Los aceites volátiles incluyen materiales que no son "no volátiles" como se ha definido anteriormente.

- 30 Los aceites no volátiles pueden seleccionarse de aceites de silicona no volátiles, aceites de hidrocarburo no volátiles y mezclas de los mismos. Los aceites de silicona no volátiles adecuados incluyen polimetilsiloxanos lineales y, preferentemente, los aceites de silicona no volátiles son dimeticonas de alto peso molecular. Los ejemplos de polimetilsiloxanos lineales disponibles en el mercado incluyen DC 200 Fluid 20Cst, DC 200 Fluid 100Cst, DC 200 Fluid 350Cst de Dow Corning Corporation.

- 35 Los aceites de hidrocarburos no volátiles adecuados incluyen ésteres ramificados de diglicerina o triglicerina o los ésteres de 1,2,3,4-butanotriol o eritritol, dieritritol o trieritritol. Preferentemente, los aceites de hidrocarburo no volátiles comprenden eritritil trietilhexanoato (disponible como Salacos E-38 de Nisshin Oilio) y poligliceril-2 triisoestearato (disponible como Cosmol 43V de Nisshin Oilio), dietil hexil carbonato (disponible como Tegosoft DEC de Degussa), dicapril Éter (disponible como Cetiol OE de Cognis AG), dicapril Carbonato (disponible como Cetiol CC de Cognis AG), isononil isononanoato (disponible como Lanol 99 de Seppic), tridecil Neopentanoato (proporcionado como Ceraphyl 55 de International Specialty Products) o una mezcla de los mismos.

- 40 Los aceites volátiles pueden seleccionarse de aceites de silicona volátiles, tanto funcionalizados como no funcionalizados, aceites de hidrocarburos volátiles y mezclas de los mismos. El aceite volátil útil en la presente invención puede ser saturado o insaturado, tener una cadena sencilla o ramificada o una estructura cíclica o tener una combinación de uno cualquiera o más de dichos elementos.

- 45 Los ejemplos de aceites de hidrocarburos volátiles incluyen polidecanos tales como isododecano e isodecano (por ejemplo, Permethyl-99A que está disponible de Presperse Inc.) y las isoparafinas C7-C15 (tales como la Serie Isopar disponible de Exxon Chemicals).

- 50 El aceite de silicona volátil puede seleccionarse de ciclopentasiloxano, ciclohexasiloxano o una mezcla de los mismos. Los ejemplos de aceites de silicona cíclica volátiles disponibles en el mercado incluyen DC 244, DC 245, DC 344 y DC 345 de Dow Corning Corp.; líquidos de silicona SF-1204 y SF-1202 de Momentive Performance Materials; GE 7207 y 7158 de General Electric Co.; y SWS-03314 de SWS Silicones Corp.

- 55 El aceite de silicona volátil lineal puede ser polimetilsiloxano lineal. Un ejemplo de polimetilsiloxanos lineales disponibles en el mercado incluye DC 200 Fluid, 5Cst de Dow Corning Corp.

- 60 La composición cosmética de la invención puede comprender además uno o más polisacáridos seleccionados de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de polisacáridos aniónicos (por ejemplo ácido alginico, pectina, goma de xantano, ácido hialurónico, condroitina sulfato, goma arábica, goma karaya, goma de tragacanto, carboximetilquitina, goma de celulosa, glucosaminoglucanos), polisacáridos catiónicos (por ejemplo quitosano, quitosano acetilado, goma guar catiónica, hidroxietilcelulosa catiónica (HEC)), polisacáridos no iónicos (por ejemplo almidón, dextrinas, goma guar, éteres de celulosa tales como hidroxietilcelulosa, metilcelulosa y nitrocelulosa), polisacáridos anfotéricos

(por ejemplo, carboximetilquitosano, N-hidroxi-dicarboxietil-quitosano, almidón de patata modificado) y polisacáridos hidrófobos (por ejemplo cetil hidroxietilcelulosa, policuaturnio²⁴).

La composición cosmética puede comprender además una sustancia adecuada como un filtro solar tal como un filtro solar orgánico, por ejemplo un derivado cinámico. El activo de filtro solar orgánico puede seleccionarse de filtro solar orgánico hidrófilo, filtro solar orgánico hidrófobo, o mezclas de los mismos. Los ejemplos adecuados de filtros solares pueden encontrarse en el CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7ª edición volumen 2, págs. 1672, editado por Wenning y Mc Ewen (The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, DC 1997).

El filtro solar orgánico puede seleccionarse de derivados de alquil β,β -difetilacrilato, derivados de α -ciano β,β -difetilacrilato, derivados de antranilato, derivados de benzofenona, derivados de alcanfor, derivados de dibenzoilmetano, derivados p-aminobenzoicos, derivados salicílicos, derivados de triazina o mezclas de los mismos. Por ejemplo el filtro solar orgánico hidrófobo puede seleccionarse de 4-(1,1-dimetiletil)-4'-metoxidibenzoilmetano; 4-isopropildibenzoilmetano; 4-(1,1-dimetiletil)-4'-metoxidibenzoilmetano, 2-etilhexil-2-ciano-3,3-difenilacrilato o una mezcla de los mismos.

Un ejemplo de 4-(1,1-dimetiletil)-4'-metoxidibenzoilmetano disponible en el mercado, también conocido como butil metoxidibenzoilmetano o Avobenzona, incluye Parsol TM 1789 de Givaudan Roure SA y Eusolex TM 9020 de Merck & Co., Inc. Un ejemplo de 4-isopropildibenzoilmetano disponible en el mercado, también conocido como isopropildibenzoilmetano, incluye Eusolex TM 8020 de Merck & Co., Inc. Los ejemplos de 2-etilhexil-2-ciano-3,3-difenilacrilato disponibles en el mercado, también conocidos como Octocrileno, incluyen Uvinul N539 SG de BASF; y Eusolex OCR de Rona/Merck.

En algunas realizaciones el filtro solar orgánico hidrófilo puede ser ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico. Un ejemplo de ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico disponible en el mercado, también conocido como PBSA, incluye Eusolex 232 de Rona/Merck.

Pueden encontrarse ejemplos adecuados de filtros solares derivados cinámicos en el CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7ª edición volumen 2, págs. 1672, editado por Wenning y Mc Ewen (The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc., Washington, DC 1997). El derivado cinámico puede seleccionarse de 2-etilhexil-p-metoxicinamato, dietanolamina metoxicinamato, 2-etoxietil-p-metoxicinamato o una mezcla de los mismos. Por ejemplo, el derivado cinámico puede ser 2-etilhexil-p-metoxicinamato.

La composición cosmética puede combinarse con un exfoliante químico seleccionado de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de alfa hidroxiácidos (AHA), beta hidroxiácidos (BHA) o poli hidroxiácidos, tales como ácido salicílico, ácido glicólico, ácido cítrico y ácido málico.

Los extractos que pueden incorporarse en la composición cosmética incluyen, pero sin limitación, extractos vegetales, que pueden comprender compuestos fenólicos tales como, por ejemplo, flavonoides (por ejemplo, glicosil rutina, ácido ferúlico, ácido cafeico), furfuralidil glucitol, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, ácido de resina nordihidroguayarática, ácido nordihidroguayarático, trihidroxibutirofenona y derivados de los mismos. Los extractos vegetales particulares para uso en la composición de la invención incluyen extracto de aloe vera, extracto de ginseng y extracto de equiseto.

El extracto de ginseng puede obtenerse extrayendo con un disolvente hidrófilo (en particular, agua, etanol, glicol o cualquier mezcla de los mismos) la raíz de *Panax ginseng*. El extracto contiene saponinas, esteroides, carbohidratos, pectina, vitaminas, minerales y lípidos.

El extracto de equiseto puede obtenerse extrayendo con un disolvente hidrófilo (por ejemplo, agua, etanol, glicol o cualquier mezcla de los mismos) la hierba completa de *Equisetum arvense*. El extracto contiene silicatos, flavonoides, saponósidos, ácido cafeico y ácido ferúlico.

La composición cosmética puede comprender además un agente acondicionante de la piel. El agente acondicionante de la piel puede seleccionarse de humectantes, exfoliantes, emolientes o mezclas de los mismos. Los humectantes incluyen alcoholes polihídricos tales como glicerina, propilenglicol, dipropilenglicol, polipropilenglicol, polietilenglicol, sorbitol, hidroxipropil sorbitol, hexilenglicol, 1,3-butilenglicol, 1,2,6-hexanotriol, glicerina etoxilada, glicerina propoxilada o mezclas de los mismos.

Los ejemplos de antioxidantes que pueden combinarse con la composición de la invención incluyen pero sin limitación aminoácidos, vitaminas, minerales, carotenoides, péptidos, tioles, compuestos de sulfoximina, quelantes, ácidos grasos insaturados, compuestos fenólicos, extractos vegetales, estilbenos, ácido úrico, manosa, ácido clorogénico, imidazoles (por ejemplo ácido urocánico), furfuralidenosorbitol, ubiquinona, ubiquinol, plastoquinona, fitoesteroides y derivados de los mismos (por ejemplo sales, ésteres, éteres, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, péptidos y/o derivados lipídicos), algunos de los cuales se han descrito anteriormente.

Las vitaminas pueden seleccionarse de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de vitamina A y derivados de la misma (por ejemplo retinoide o retinol o sus derivados tales como retinil palmitato o retinil proprionato), biotina, ácido fólico, pantotenato cálcico, nicotinamida, piridoxina HCl, piridoxal HCl, riboflavina, tiamina HCl, timidina, vitamina B12, vitamina B3 (por ejemplo, niacinamida), vitamina B5 (por ejemplo, pantenol), vitamina C y derivados de los mismos (por ejemplo ascorbil palmitato, ascorbil fosfato de Mg, ascorbil acetato), tocoferoles y derivados (por ejemplo acetato de vitamina E).

Los minerales pueden seleccionarse de, pero sin limitación, una o más sales cualesquiera de molibdenato (por ejemplo $(\text{NH}_4)\text{OMo}_7\text{O}_{24}$) aluminio (por ejemplo AlCl_3), calcio (por ejemplo CaCl_2), cobalto (por ejemplo CoCl_2), cromo (por ejemplo $\text{CrK}(\text{SO}_4)$), cobre (por ejemplo CuSO_4), hierro (por ejemplo $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, FeSO_4), potasio (por ejemplo KCl), magnesio (por ejemplo MgCl_2), manganeso (por ejemplo MnCl_2 , MnSO_4), fosfato (por ejemplo Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4), carbonato (por ejemplo NaHCO_3), silicato (por ejemplo Na_2SiO_3), sodio (por ejemplo NaCl), vanadato (por ejemplo NH_4VO_3), níquel (por ejemplo NiCl_2), estaño (por ejemplo SnCl_2), cinc (por ejemplo, ZnO , ZnSO_4), selenio (por ejemplo selenometionina, ebseleno, H_2SeO_3 , Na_2SeO_3), sulfato y nitrato.

Los carotenoides pueden seleccionarse de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de carotenos, por ejemplo α -caroteno, β -caroteno, ψ -licopeno, fitoeno, etc. y derivados de los mismos.

Los tioles pueden seleccionarse de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de aurotioglucosa, propiltiouracilo, tioredoxina, ácido lipoico, glutatión, cisteína, cistina, cistamina y sus glicosil, N-acetil, metil, etil, propil, amil, butil y lauril, palmitoil, oleil, γ -linoleil, colesteril y gliceril ésteres y las sales de los mismos, dilauril tioldipropionato, diestearil tioldipropionato, ácido tioldipropiónico y derivados de los mismos.

Los compuestos de sulfoximina pueden seleccionarse de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de homocisteína sulfoximina, butionina sulfonas, penta-, hexa-, heptationina sulfoximina, que pueden incluirse en la composición de modo que se proporcionen en dosificaciones muy bajas (por ejemplo, pmol a $\mu\text{mol/kg}$).

Los quelantes pueden seleccionarse de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de apoferritina, desferral, lactoferrina, α -hidroxiácidos grasos, ácido palmítico, ácido fítico, α -hidroxiácidos (por ejemplo ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico), ácido húmico, ácido biliar, extractos biliares, bilirrubina, biliverdina, EDTA, EGTA y derivados de los mismos.

Los ácidos grasos insaturados pueden seleccionarse de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de ácido γ -linolénico, ácido linoleico, ácido oleico y derivados de los mismos.

Los estilbenos y derivados de los mismos incluyen, por ejemplo, óxido de estilbeno y óxido de trans-estilbeno.

Pueden incorporarse una diversidad de principios activos opcionales adicionales en las composiciones cosméticas de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de estos ingredientes adicionales incluyen activos de cuidado de la piel adicionales tales como farnesol, bisabolol, fitantriol, urea, guanidina (por ejemplo aminoguanidina); compuestos de hexaminidina, sales o derivados de los mismos; aminas de azúcares; agentes de autobronceado (por ejemplo deshidroxiacetona); agentes estructurantes; agentes gelificantes hidrófilos; medicamentos antiacné (resorcinol, ácido salicílico y similares); agentes calmantes y de curación de la piel tales como alantoína y similares; y agentes adecuados para fines estéticos tales como aceites esenciales, fragancias, sensitivos cutáneos, opacificantes y compuestos aromáticos (por ejemplo aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto y eugenol).

Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al cuerpo empleando técnicas bien conocidas en este campo.

La composición puede estar en cualquier forma de dosificación apropiada para permitir el suministro o para dirigirse a células o tejidos particulares, por ejemplo como una emulsión o en liposomas, niosomas, microesferas, nanopartículas o similares con las que puede absorberse, adsorberse, incorporarse o unirse el principio activo. Esto puede convertir eficazmente el producto en una forma insoluble. Estas formas en partículas pueden superar los problemas tanto de estabilidad (por ejemplo degradación) como de suministro.

Se prefiere el uso de soluciones, suspensiones, geles y emulsiones, por ejemplo el principio activo puede portarse en agua, un gas, un líquido basado en agua, un aceite, un gel, una emulsión, una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, una dispersión o una mezcla de los mismos.

El emulsionante puede seleccionarse de emulsionantes no iónicos, emulsionantes aniónicos, emulsionantes catiónicos, emulsionantes zwitteriónicos, emulsionantes anfotéricos o mezclas de los mismos. Se conocen en la técnica emulsionantes. Véase, por ejemplo, McCutcheon's, Detergents and Emulsifiers, Edición Norteamericana (1986), publicada por Allured Publishing Corporation.

Quando el vehículo cosméticamente aceptable es una solución de agua en silicona, los emulsionantes se seleccionan preferentemente de copolímeros de polioxialquileño, copolímeros de poliglicerilo o mezclas de los mismos. Se describen copolímeros de polioxialquileño, también conocidos como poliéteres de silicona en detalle en el documento US 4.268.499. Un ejemplo de copolímeros de polioxialquileño disponibles en el mercado incluye DC5225C o DC2-5185C (PEG/PPG-18/18 dimeticona disponible como mezcla con ciclopentasiloxano) de Dow Corning Corp.; y KF6017 o KF6028 (PEG-9 dimeticona) de Shin-Etsu Inc. Los ejemplos de emulsionantes de poliglicerilo disponibles en el mercado incluyen KF6100 y KF6104 de Shin-Etsu Inc.

Las composiciones son preferentemente para administración tópica (es decir, a la piel).

Las composiciones tópicas incluyen geles, cremas, ungüentos, pulverizaciones, lociones, pomadas, barras, jabones, polvos, películas, aerosoles, gotas, espumas, soluciones, emulsiones, suspensiones, dispersiones, por ejemplo dispersiones de vesículas no iónicas, leches y cualquier otra forma cosmética convencional de la técnica.

Los ungüentos, geles y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y, en general, también contendrán uno o más agentes emulsionantes, de dispersión, de suspensión, espesantes o colorantes. Los polvos pueden formarse con la ayuda de cualquier base de polvo adecuada. Las gotas y soluciones pueden formularse con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes de dispersión, solubilización o suspensión. Las pulverizaciones de aerosol se suministran convenientemente a partir de envases presurizados, con el uso de un propulsor adecuado.

En algunas realizaciones el polipéptido y las composiciones cosméticas descritas en el presente documento pueden administrarse por vía tópica a la piel mediante un producto, dispositivo o material al que se ha aplicado, impregnado o unido químicamente el polipéptido o la composición. Para este fin, pueden recubrirse, impregnarse o unirse químicamente con un polipéptido o composición como se describe en el presente documento vendas, parches (por ejemplo parches adhesivos), gasa, cinta quirúrgica, hisopos de algodón u otros materiales absorbentes, por ejemplo una borla, vellón o esponja, o matrices de apoyo. Por ejemplo, muchas composiciones pueden aplicarse a la piel usando parches dérmicos que se describen bien en la técnica, por ejemplo documentos US 2008/0038300, US 2009/0043236, WO 2005/067499 y WO 2009/085302. En algunas realizaciones, el material que comprende el polipéptido o la composición como se describe en el presente documento puede estar en forma de un dispositivo que, por ejemplo puede llevar el sujeto para tratar. Por ejemplo, el polipéptido o la composición como se describe en el presente documento puede aplicarse, impregnarse o unirse químicamente en un material o matriz de apoyo que forma todo o parte de un pañal, guante, un calcetín, etc.

Las composiciones cosméticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dosificador junto con instrucciones para su administración.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención comprende la provisión de un producto, material o dispositivo que está recubierto, impregnado o unido químicamente con un polipéptido o composición como se describe en el presente documento. La invención también se extiende a dichos productos, materiales y dispositivos para usos como se describen en el presente documento. Preferentemente dicho producto es una venda, parche (por ejemplo parche adhesivo), gasa, cinta quirúrgica o hisopo de algodón o dicho dispositivo es un pañal, guante o calcetín.

La concentración de principio activo en composiciones de la invención depende del modo de administración, el ciclo de tratamiento, la edad y el peso del paciente, la indicación cosmética, el cuerpo o área corporal para tratar y puede variarse o ajustarse según se elija. En general, sin embargo, los intervalos de concentración para el compuesto descrito en el presente documento son 0,0001, 0,0005, 0,001 o 0,01 a 50 %, por ejemplo 0,0005-40 %, por ejemplo 0,01 a 25 %, tal como 0,1 o 0,5 a 5, por ejemplo 1-5 % (p/p o v/v de la preparación final para administración, particularmente para administración tópica) por ejemplo una solución 1 % de la composición anteriormente mencionada preparada de acuerdo con el método de la invención.

Quando están presentes más de un compuesto, por ejemplo agentes hidratantes adicionales como se describe en el presente documento, cada compuesto puede estar presente en las cantidades descritas anteriormente. Dichas concentraciones se determinan por referencia a la cantidad del compuesto en sí mismo y por lo tanto deberían realizarse provisiones apropiadas para tener en cuenta la pureza de la composición. Las dosis individuales eficaces para los polipéptidos pueden estar en el intervalo de 0,001 a 100 mg/cm²/día, por ejemplo 0,1-100 mg/cm²/día, preferentemente 0,001-10 mg/cm²/día, por ejemplo 0,1-10 mg/cm²/día, cuando se aplican por vía tópica, dependiendo del animal mamífero que se trate, tomadas como una dosis individual.

Preferentemente se emplearían soluciones líquidas, cremas o suspensiones para administración tópica de los polipéptidos o composiciones descritos en el presente documento.

Los animales a los que pueden aplicarse o administrarse las composiciones están limitados a los mamíferos. Preferentemente los mamíferos son primates, animales domésticos, ganado y animales de laboratorio. Por lo tanto los animales mamíferos preferidos incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas, gatos, perros, monos, cerdos, vacas,

cabras, ovejas y caballos. De forma especialmente preferente las composiciones se aplican, o administran, a seres humanos.

Los siguientes Ejemplos se proporcionan solamente como ilustración en la que las Figuras indicadas son las siguientes:

La Figura 1 muestra una fotografía de un sujeto tratado con la composición que comprende el polipéptido desvelado en el presente documento antes del tratamiento (línea basal), después de 2 semanas y después de 12 semanas de tratamiento. La reducción de diversas señales de piel envejecida es evidente después de tanto 2 como 12 semanas.

Los valores proporcionados indican los cambios promedio para 35 participantes.

La Figura 2 muestra una fotografía en primer plano del sujeto en la Figura 1 para enfatizar la reducción de líneas finas y arrugas vistas después de 2 y 12 semanas de tratamiento con la composición que comprende el polipéptido desvelado en el presente documento.

La Figura 3 muestra una fotografía en primer plano de un sujeto tratado con la composición que comprende el polipéptido desvelado en el presente documento antes del tratamiento (línea basal) y después de 12 semanas de tratamiento. El área rodeada muestra una reducción clara de las arrugas después de 12 semanas de tratamiento.

La Figura 4 muestra un diagrama de barras que representa el porcentaje de sujetos que se consideró que habían mejorado en diversas señales de envejecimiento basándose en una graduación clínica táctil/visual en ambos lados de la cara.

La Figura 5 muestra un diagrama de barras que representa el aumento medio de la hidratación de la piel de aproximadamente 23 % basándose en 4 sujetos en comparación con la situación no tratada después de 3 semanas de un tratamiento dos veces al día con una composición que comprende el polipéptido descrito en el presente documento.

La Figura 6 muestra un diagrama de barras que representa la reducción media de la pérdida de agua transepidérmica (función de barrera cutánea mejorada) de aproximadamente 14,5 % basándose en 4 sujetos en comparación con la situación no tratada después de 3 semanas de un tratamiento dos veces al día con una composición que comprende el polipéptido desvelado en el presente documento.

La Figura 7 muestra un diagrama de barras que representa la reducción media del volumen de arrugas del ojo de aproximadamente 23 % basándose en 4 sujetos en comparación con la situación no tratada después de 3 semanas de un tratamiento dos veces al día con una composición que comprende el polipéptido desvelado en el presente documento.

La Figura 8 muestra un diagrama de barras que representa la reducción media del contenido de melanina de aproximadamente 10 % basándose en 4 sujetos en comparación con la situación no tratada después de 3 semanas de un tratamiento dos veces al día con una composición que comprende el polipéptido desvelado en el presente documento.

Ejemplo 1: aislamiento de leucolectina y preparaciones que comprenden leucolectina

Se han descrito proteínas de leucolectina (expuestas posteriormente) y métodos para proporcionarlas en detalle en el documento WO 2010/049688. Sin embargo, para mayor compleción, se describe posteriormente un método preferido para preparar una composición que comprende leucolectina y ejemplifica el método descrito anteriormente.

Un método para preparar zonas parcialmente purificadas que puede usarse como el material de partida para aislar el polipéptido de la invención se proporciona en el documento WO99/29836 (particularmente en el Ejemplo 1 del método descrito, pero opcionalmente sin la etapa de urea).

La leucolectina se purificó a partir del líquido de incubación de salmón. Para mejorar la concentración de proteínas del líquido de incubación, los huevos de salmón se transfirieron a volúmenes mínimos de agua antes de la eclosión. Puede inducirse eclosión altamente sincrónica mediante temperaturas (ambiente) elevadas o por desoxigenación (Oppen-Berntsen *et al.*, 1990, *Aquaculture*, 86, págs. 417-430), que produce un volumen pequeño de preparación altamente concentrada de leucolectina en bruto y proteínas asociadas. La eclosión debería completarse en un periodo de 2 horas para más del 95 % de los embriones.

El líquido de incubación se filtró usando un filtro convencional con un tamaño de poro de 7 µm, para retirar material que probablemente obstruya los filtros en etapas de filtración posteriores. Este filtrado, el líquido de incubación procesado, puede congelarse durante años sin degradación significativa, antes de descongelarse y emplearse para purificación de proteínas adicional. Este hecho simplifica en gran medida la producción de un material de partida para purificar leucolectina de salmón.

El líquido de incubación procesado se sometió a filtración usando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm y se recogió el filtrado. El filtrado se diafiltró después con un tamaño de exclusión de filtro de 8 kDa para intercambiar el tampón por agua de líquido de incubación. En este caso, el tampón contenía fosfato 0,5 mM y NaCl 1 mM, aunque son igualmente adecuados otros tampones. Por ejemplo, son adecuados solución salina tamponada con fosfato o tampones que contienen Tris milimolar (por ejemplo, 10 mM) a pH aproximadamente neutro o ligeramente alcalino (pH 7,5-8,5), que contienen NaCl 5 mM. El retenido de la etapa de diafiltración se recogió y se diluyó por la adición del tampón.

El diafiltrado se sometió a ultrafiltración usando ultrafiltros con exclusión por tamaño de 100 kDa y se recogió el filtrado que comprendía la leucolectina. Finalmente, el filtrado se sometió a filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm y se recogió el filtrado final. Este filtrado es una preparación enriquecida de leucolectina.

Ejemplo 2: actividad *in vitro* de leucolectina en fibroblastos

Materiales y métodos

Se aplicaron composiciones preparadas de acuerdo con el método en el Ejemplo 1 a fibroblastos senescentes (fibroblastos dérmicos humanos, replicativos del modelo de envejecimiento de Hayflick Hayflick, L y Moorhead, PS (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res 25:585-621). A este respecto, los fibroblastos senescentes liberan cantidades aumentadas de MMP en comparación con fibroblastos jóvenes y, como se ha analizado anteriormente, la actividad de MMP se asocia tanto con las señales como con los síntomas de envejecimiento y cicatrización. En particular MMP-1, conocida como colagenasa intersticial o colagenasa de fibroblastos, está implicada en la degradación de la matriz extracelular debido a que escinde el colágeno intersticial de tipos I, II y III.

Se aplicaron tres concentraciones diferentes de la composición de leucolectina a fibroblastos senescentes, 0,015 %, 0,050 % y 0,150 % [v/v]. La composición es una preparación enriquecida de leucolectina y el v/v se refiere al volumen total de la preparación enriquecida (incluyendo componentes distintos de leucolectina) por unidad de volumen. La concentración de MMP-1 se midió mediante ELISA. Se realizaron dos experimentos de control simultáneamente. El primer control implicó el uso de fibroblastos dérmicos humanos normales (FDHN) que se aislaron de la dermis de prepucio juvenil o piel de adulto de diferentes localizaciones como la cara, y por lo tanto demostraron niveles de "no envejecidos" normales de MMP-1 (P7-NHDF). El segundo control comprende células senescentes que se pusieron en contacto con TGF-β (10 ng/ml) en lugar de leucolectina. TGF-β (factor de crecimiento transformante β) es una citocina multifuncional que regula la proliferación y diferenciación celular, la modelización y la reparación tisular. Se sabe que inhibe la liberación de MMP-1. Los resultados se muestran en la Tabla 2, a partir de la que puede verse que las composiciones de leucolectina a concentraciones de 0,050 % y 0,150 % dan como resultado inhibición casi completa de la liberación de MMP-1 de fibroblastos senescentes, de modo que los niveles están por debajo incluso de los de fibroblastos juveniles. Estos resultados indican que puede esperarse que la leucolectina sea útil en la mejora de la apariencia cosmética de la piel, particularmente piel envejecida y cicatrizada, que muestran niveles aumentados de MMP y/o actividad de MMP anómala. De hecho, los resultados posteriores, que muestran los efectos de una composición que comprende leucolectina confirman los efectos de dichas composiciones en la piel envejecida.

La leyenda de la Tabla es la siguiente:

⁽¹⁾: umbral para significación estadística

ns: > 0,05, No significativo

* : 0,01 a 0,05, Significativo

** : 0,001 a 0,01, Muy significativo

*** : < 0,001, Extremadamente significativo

< o > : inferior o superior al límite de detección

Tratamiento		Datos básicos							Datos normalizados		Viabilidad (MTT)	
Compuesto de ensayo	Concentración	MMP-1 (ng/ml) Ajustado a factor de dilución	MMP-1 Media (ng/ml)	Error Típico (ng/ml)	% de Control de P17-F	Error Típico (%)	$p^{(1)}$	Inhibición (%)	Error Típico (%)	$p^{(1)}$	% de Control de P17-F	
P7-NHDF (fibroblastos juveniles)	Control (sin tratamiento)	13,9	15,3	0,7	32	1	***	68	1	***	139	
		15,8										
		16,2										
	Control (sin tratamiento)	42,8	47,5	1,7	100	4	-	0	4	-	100	
		48,6										
		51,6										
		41,9										
		49,1										
		51,4										
P17-F (fibroblastos senescentes)	TGF- β 10 ng/ml	41,8	39,5	2,1	83	5		17	5	*	120	
		34,3										
		41,7										
		42,3										
		45,2										
	31,8											
	0,015 %	49,1	52,3	2,0	110	4		ns	-10	4	ns	133
		51,9										
		56,0										
		<4,7										
<4,7												
Leucolectina 0,050 %		<4,7	<4,7	0,0	<10	0	***	>90	0	***	185	
		<4,7										
		<4,7										
0,150 %		<4,7	<4,7	0,0	<10	0	***	>90	0	***	181	
		<4,7										
		<4,7										

Ejemplo 3: efectos *in vivo* de leucolectina en la piel envejecida

Se preparó una composición que comprendía leucolectina como se ha descrito en el Ejemplo 1, sin embargo, se omitió la penúltima etapa de ultrafiltración a través de un filtro con un tamaño de exclusión de 100 kDa. La composición se preparó como una loción cutánea 1 % y 3 % [v/v] (volumen total de composición por unidad de volumen de loción), las dos lociones cutáneas activas en el ensayo, y se comparó con una loción cutánea de control que no comprendía el componente activo, es decir la composición de líquido de incubación. La loción cutánea fue una emulsión de aceite en agua (AC/AG). La fase oleosa representa el 9 % de la composición total y se emulsionó con lecitina hidrogenada.

Se realizó un ensayo clínico controlado con placebo, con doble ocultación, para evaluar la eficacia y tolerancia de tratamientos cutáneos tópicos en mujeres con piel facial fotodañada, es decir envejecida, de leve a moderada. La duración de este ensayo fue de 12 semanas con visitas en línea basal, semana 2, semana 6 y semana 12. La eficacia se evaluó usando graduación visual, instrumentación, fotografías de VISIA CR digitales y cuestionarios de autoevaluación del sujeto.

Número de sujetos

Ciento un (101) sujetos femeninos completaron la participación en el estudio (N> 30 para los tres tratamientos, es decir, un placebo y dos composiciones que comprenden el componente activo, es decir leucolectina, a diferentes concentraciones).

Población e identificación de sujetos

Los sujetos fueron mujeres sanas de edades entre 40 y 65 años y se les asignó un número de tres dígitos que, cuando se usó junto con el número de estudio clínico, identificó de forma única a cada sujeto en el estudio. Este número permaneció con el sujeto durante todo el estudio para mantener la anonimidad del experimento.

*Criterios de elegibilidad*Criterios de inclusión

1. Mujeres, de edades entre 40 y 65 años, inclusive, que tenían buena salud general como se determinó mediante el cuestionario de salud y elegibilidad.
2. Voluntad de cooperar y participar siguiendo los requisitos del estudio durante el transcurso del estudio e informar de cualquier síntoma adverso inmediatamente.
3. Fotodaño clínicamente determinado de leve a moderado (líneas finas, arrugas, hiperpigmentación, laxitud y aspereza) en la cara correspondiente a la escala de degradación de Griffith modificada con puntuaciones de 3-7.
4. Libres de cualquier patología o afección cutánea facial física (por ejemplo dermatitis atópica, eccema, psoriasis, dermatitis seborreica) que podrían alterar las evaluaciones de los sitios de ensayo o aumentar el riesgo para la salud al sujeto por su participación en el estudio.
5. Voluntad de evitar periodos prolongados de exposición al sol y todo uso de camas de bronceado durante el transcurso del estudio. Debería tenerse especial cuidado de llevar ropas protectoras, incluyendo gafas de sol, y evitar la exposición al sol desde las 10:00 a.m. hasta las 4:00 p.m.
6. Voluntad de continuar usando todas las marcas habituales de cosméticos colorantes, limpiadores, tónicos (cuando fuera aplicable) y producto desmaquillante durante el transcurso del estudio. Los individuos tuvieron que evitar usar cualquier producto antienviejimiento o productos aclaradores de la piel distintos del material de ensayo asignado.
7. Voluntad de retirar todo el maquillaje al menos 20 minutos antes de cada visita clínica programada. No deberían aplicarse otros productos tópicos a la cara o el área de los ojos hasta que se hubiera completado la visita del estudio. Si un sujeto llegara no habiendo retirado todo el maquillaje, se le pediría retirar el maquillaje residual en la clínica y esperar al menos 20 minutos antes de los procedimientos.
8. Los individuos que estaban tomando terapias de reemplazo hormonal u hormonas para control de la natalidad tuvieron que tomar un régimen estable durante al menos un mes antes del inicio del estudio y tenían que tener la voluntad de continuar y no cambiar esta medicación durante el transcurso del estudio. Los individuos que no estaban tomando HRT u hormonas al inicio del estudio tuvieron que tener voluntad de no comenzar a usarlas durante el transcurso del estudio.
9. Voluntad de cooperación y participación siguiendo los requisitos del estudio e informar de cualquier síntoma adverso inmediatamente.

Criterios de exclusión

1. Individuos con un historial de intolerancia o alergia a cualquier producto de cuidado personal.
2. Individuos que hubieran usado cualquier producto de aclaramiento de la piel recetado o sin receta menos de 30 días antes de la entrada en el estudio.
3. Individuos que tuvieran una afección y/o enfermedad de la piel que el investigador examinador considerara inapropiada para la participación.

4. Individuos que estuvieran dando el pecho, embarazadas o planearan quedarse embarazadas durante el estudio.
5. Individuos que hubieran usado de forma habitual cualquiera antienvjecimiento, antiarrugas, antioxidante tópico, menos de 30 días antes de la entrada en el estudio.
6. Individuos que hubieran usado un tratamiento cutáneo facial enzimático en un periodo de 6 meses antes del inicio del estudio.
7. Uso de Retin-A®, Retin-A Micro®, Renova®, Avita®, Tazorac®, Avage® o Differin® u otros retinoides tópicos en un periodo de 3 meses antes del inicio del estudio, o que hubieran tomado Accutane o un retinoide oral en los últimos 6 meses.
8. Uso rutinario de productos que contenían alfa, beta o polihidroxiácido (incluyendo ácido salicílico y Lac-hidrina), retinol o derivados de retinol u otros productos “antienvjecimiento” en la cara en un periodo de 30 días antes del inicio del estudio.
9. Individuos que habían recibido un tratamiento de dermoabrasión facial o exfoliación química en un periodo de 3 meses de tratamiento o durante el estudio.
10. Individuos que habían recibido tratamiento con luz RF, u otros dispositivos en el área tratada dentro del área tratada en un periodo de 6 meses antes del tratamiento o durante el estudio.
11. Individuos que habían recibido Botox, colágeno, inyecciones de grasa u otros métodos de aumento con material inyectado o implantado en el área tratada en un periodo de 9 meses antes del tratamiento o durante el estudio.
12. Individuos que se habían sometido a un procedimiento de rejuvenecimiento, estiramiento facial o cirugía del ojo o del párpado en un periodo de 12 meses antes del inicio de este ensayo.
13. Individuos que tenían afecciones dermatológicas preexistentes y/o latentes en la cara (por ejemplo, vitiligo, dermatitis atópica, psoriasis, rosácea, eccema, dermatitis seborreica, excoiraciones graves, etc.) o una afección médica/enfermedad que en opinión del investigador podría interferir con el resultado del estudio.
14. Individuos que habían tenido un historial de trastornos de inmunosupresión/inmunodeficiencia (incluyendo infección por VIH o SIDA) o que están usando actualmente medicamentos inmunosupresores.
15. Individuos que estaban participando en cualquier otro estudio de uso clínico (los estudios de parches son aceptables).
16. Los individuos que tenían una enfermedad incontrolada tal como diabetes, hipertensión, hipertiroidismo o hipotiroidismo. Algunos individuos que tenían múltiples afecciones de la salud se excluyeron de su participación incluso si las afecciones estaban controladas por la dieta, medicación, etc.
17. Individuos que habían participado en cualquier ensayo clínico en un periodo de 28 días antes de su inclusión en el estudio.

Los individuos se admitieron en el estudio según el criterio del investigador o alguien nombrado por el basándose en el historial médico y los hallazgos de la entrevista y el examen antes del estudio.

Diseño del estudio

El ensayo clínico controlado por placebo, con doble ocultación, se realizó para evaluar la eficacia de tratamientos cutáneos tópicos en mujeres con piel facial fotodañada, es decir envejecida, de leve a moderada. La duración de este ensayo fue de 12 semanas con visitas programadas en línea basal, semana 2, semana 6 y semana 12. La eficacia se evaluó usando graduación visual, instrumentación, fotografías de VISIA CR digitales y cuestionarios de autoevaluación del sujeto.

Tres grupos de N>30 por grupo completaron el estudio. Los sujetos recibieron un tratamiento cutáneo activo, concretamente la composición de leucolectina descrita anteriormente, o un control de vehículo (agua) para aplicar a la cara durante doce semanas. Se realizó asignación aleatoria de los sujetos a los tres grupos según una asignación aleatoria predeterminada.

Visita:	Visita 1 Línea basal	Visita 2 Semana 2	Visita 2 Semana 6	Visita 2 Semana 12
Consentimiento informado, trámites de elegibilidad, exploración facial.	X			
Puntuación clínica del <u>lado derecho e izquierdo</u> con respecto a líneas, arrugas, hiperpigmentación moteada, laxitud, claridad y aspereza.	X	X	X	X
Puntuación clínica del <u>lado derecho e izquierdo</u> con respecto a irritación objetiva y subjetiva (eritema, sequedad, quemazón/escozor*, prurito*, sensación de tirantez/sequedad*) *indicado por el miembro del panel.	X	X	X	X
Captura de imágenes por VISIA-CR del <u>lado derecho e izquierdo</u> .	X	X	X	X
Mediciones por cutometer del lado derecho e izquierdo de la cara.	X	X	X	X

Visita:	Visita 1 Línea basal	Visita 2 Semana 2	Visita 2 Semana 6	Visita 2 Semana 12
Mediciones de pérdida de agua transepidérmica (PATE) en el lado derecho e izquierdo.	X	X	X	X
Distribución del material de ensayo, vehículo, instrucciones de uso, diario y calendario	X		X	
Compleción de cuestionarios de autoevaluación para el lado derecho e izquierdo.		X	X	X
Revisión del diario y peso del producto para cumplimiento.		X	X	X

Evaluaciones de eficacia y tolerabilidad

- 5 Un clasificador clínico experto evaluó el lado derecho e izquierdo de la cara con respecto a los parámetros mostrados a continuación. Se usó una escala de Griffith modificada, en la que 0 = ninguno, 1-3 = leve, 4-6 = moderado y 7-9 = grave. Se usaron medios puntos cuando fue necesario para describir mejor la condición cutánea.
- Líneas finas
 - Arrugas
- 10
- Hiperpigmentación
 - Laxitud
 - Apagado/Mate (Claridad)
 - Aspereza táctil
- 15 Un clasificador clínico experto evaluó el lado derecho e izquierdo de la cara con respecto a los parámetros mostrados a continuación. Se usó una escala de cuatro puntos, en la que 0 = ninguno, 2 = leve, 3 = moderado y 4 = grave. Se usaron medios puntos cuando fue necesario para describir mejor la condición cutánea.
- Eritema
 - Sequedad/descamación
 - Sensación de quemazón/escozor
 - Prurito
 - Sensación de tirantez/sequedad
- 20
- 25 *Fotografía de VISIA CR digital*
- Se tomaron imágenes de VISIA-CR de los lados derecho e izquierdo de la cara. Se tomaron imágenes de los sujetos de modo que su pelo estaba recogido hacia atrás, se habían retirado las joyas, los ojos estaban cerrados, el sujeto estaba centrado dentro del marco y tenía una expresión facial neutra.
- 30 *Pérdida de agua transepidérmica (PATE)*
- Antes de las mediciones instrumentales, se hizo a los sujetos aclimatarse a las condiciones ambientales de la clínica durante al menos 20 minutos. Las condiciones ambientales se registraron cada hora durante las visitas del estudio. Durante este tiempo, los sujetos se graduaron, completaron cuestionarios y/o se les realizaron capturas de imágenes VISIA CR.
- 35
- Se usó el Tewameter para tomar una medición de la pérdida de agua transepidérmica (PATE) en todas las visitas. Las mediciones se tomaron en la mejilla derecha e izquierda en la intersección de líneas que se extendían hacia abajo desde la esquina del ojo y horizontalmente a través de la parte inferior de la nariz.
- 40
- El Tewameter mide PATE utilizando un sistema de cámara abierta. Una sonda portátil colocada sobre la superficie cutánea tomó muestras de humedad relativa en dos puntos por encima de la superficie, permitiendo calcular la tasa de pérdida de agua a partir del gradiente de humedad medido.
- 45 *Cutometer MPA 580*
- Se tomaron mediciones por Cutometer de todos los sujetos en todas las visitas. El Cutometer se usó para evaluar las propiedades viscoelásticas (es decir extensibilidad y elasticidad) de la piel. El instrumento aplica un vacío a un área pequeña de la piel y mide la respuesta elástica de la piel (movimiento de la piel hacia dentro y hacia fuera de la apertura) por una técnica óptica.
- 50
- Para este estudio, se usó una sonda de 2 mm, se aplicó un vacío de 30 kPa y se realizaron dos ciclos de succión y liberación. Los tiempos de ciclo fueron de 5 segundos de encendido y 10 segundos de apagado.

Se tomaron mediciones en la mejilla derecha e izquierda en la intersección de líneas que se extendían hacia abajo desde la esquina del ojo y horizontalmente a través de la parte inferior de la nariz o una localización alternativa cerca de la mandíbula.

5 *Evaluación cutánea y cuestionarios de autoevaluación*

Los sujetos completaron un cuestionario de autoevaluación de la piel que contenía preguntas que describen cómo el sujeto percibe su apariencia y condición cutánea facial en los lados derecho e izquierdo de la cara.

10 *Resultados*

Líneas finas

En la semana 2 los sujetos tratados con una loción cutánea que comprendía una de las composiciones activas mostraron una reducción de líneas finas (por ejemplo porcentaje de cambio de 5,59 % (solución 1 %) y 5,65 % (solución 3 %)) en comparación con el placebo (4,58 %). La reducción de las líneas finas continuó en la semana 6 (por ejemplo 14,34 % (solución 1 %), 14,86 % (solución 3 %) y 8,98 % (placebo)) y semana 12 (por ejemplo 23,43 % (solución 1 %), 25,99 % (solución 3 %) y 14,68 % (placebo)). Las Figuras 1 y 2 muestran un sujeto con una reducción del 28 % de líneas finas.

Arrugas

A la semana 2 los sujetos tratados con una loción cutánea que comprendía una de las composiciones activas mostraron una reducción de las arrugas (por ejemplo porcentaje de cambio de 2,15 % (solución 1 %) y 1,75 % (solución 3 %)) en comparación con el placebo (0,70 %). La reducción de las arrugas continuó en la semana 6 (por ejemplo 6,13 % (solución 1 %), 7,32 % (solución 3 %) y 3,70 % (placebo)) y la semana 12 (por ejemplo 14,72 % (solución 1 %), 15,15 % (solución 3 %) y 9,57 % (placebo)). La Figura 1 muestra un sujeto con una reducción del 12,5 % de las arrugas. La Figura 3 muestra un sujeto con una reducción del 26,32 % de las arrugas.

Hiperpigmentación

A la semana 2, los sujetos tratados con una loción cutánea que comprendía una de las composiciones activas mostraron una reducción de la hiperpigmentación (por ejemplo porcentaje de cambio de 2,11 % (solución 1 %) y 2,68 % (solución 3 %) en comparación con el placebo (0,40 %). La reducción de la hiperpigmentación continuó en la semana 6 (por ejemplo 5,61 % (solución 1 %), 7,91 % (solución 3 %) y 3,16 % (placebo)) y la semana 12 (por ejemplo 10,53 % (solución 1 %), 15,35 % (solución 3 %) y 5,73 % (placebo)). La Figura 1 muestra un sujeto con una reducción del 15 % de la pigmentación de una mancha de la edad después de 12 semanas.

Laxitud

A la semana 2, los sujetos tratados con una loción cutánea que comprendía una de las composiciones activas mostraron una reducción de la laxitud (por ejemplo porcentaje de cambio de 2,64 % (solución 1 %) y 1,62 % (solución 3 %)) en comparación con el placebo (0,87 %). La reducción de laxitud continuó en la semana 6 (por ejemplo 6,33 % (solución 1 %) y 6,61 % (solución 3 %), 2,51 % (placebo)) y la semana 12 (por ejemplo 10,55 % (solución 1 %) y 11,33 % (solución 3 %), 5,18 % (placebo)). La Figura 1 muestra un sujeto con una reducción de 7,69 % de laxitud (flacidez) después de 12 semanas.

Apagado/mate (claridad)

A la semana 2 los sujetos tratados con una loción cutánea que comprendía una de las composiciones activas mostraron una reducción de la claridad cutánea (por ejemplo porcentaje de cambio de 12,95 % (solución 1 %) y 16,00 % (solución 3 %)) en comparación con el placebo (10,67 %). La mejora continuó en la semana 6 (por ejemplo 29,26 % (solución 1 %), 28,50 % (solución 3 %) y 19,07 % (placebo)) y la semana 12 (por ejemplo 37,17 % (solución 1 %), 39,18 % (solución 3 %) y 26,72 % (placebo)). La Figura 1 muestra un sujeto con una reducción de 33,33 % de la mateidad.

Aspereza táctil

A la semana 2 los sujetos tratados con una loción cutánea que comprendía una de las composiciones activas mostraron una reducción de la aspereza táctil de la piel (por ejemplo porcentaje de cambio de 16,51 % (solución 1 %) y 20,24 % (solución 3 %)) en comparación con placebo (13,38 %). La mejora continuó en la semana 6 (por ejemplo 24,77 % (solución 1 %), 26,65 % (solución 3 %) y 16,79 % (placebo)), pero no hubo una reducción adicional a la semana 12 (por ejemplo 26,61 % (solución 1 %), 29,19 % (solución 3 %) y 15,79 % (placebo)). La Figura 1 muestra un sujeto con una reducción del 12,5 % de la aspereza táctil.

Sequedad/descamación

A la semana 2 los sujetos tratados con una loción cutánea que comprendía una de las composiciones activas mostraron una reducción de la sequedad/descamación de la piel (por ejemplo porcentaje de cambio de 72,09 % (solución 1 %) y 100,00 % (solución 3 %)) en comparación con el placebo (64,71 %). Sin embargo, a la semana 6 (por ejemplo 86,05 % (solución 1 %), 84,62 % (solución 3 %) y 100,00 % (placebo)), y la semana 12 no hubo una reducción adicional en comparación con el placebo (por ejemplo 90,70 % (solución 1 %), 100,00 % (solución 3 %) y 89,47 % (placebo)).

PATE

Aunque los sujetos tratados con una loción cutánea que comprendía una de las composiciones activas mostraron una reducción de PATE la semana 2, esta no fue claramente diferente a la del placebo (por ejemplo porcentaje de cambio de 15,35 % (solución 1 %) y 14,53 % (solución 3 %)) en comparación con el placebo (17,26 %). Sin embargo, a la semana 6 (por ejemplo 29,46 % (solución 1 %), 26,66 % (solución 3 %) y 22,96 % (placebo)) y la semana 12 hubo una reducción adicional mayor que la del placebo (por ejemplo 37,46 % (solución 1 %), 40,04 % (solución 3 %) y 34,21 % (placebo)).

Extensibilidad

Aunque los sujetos tratados con una loción cutánea que comprendía una de las composiciones activas mostraron una mejora en la extensibilidad de la piel en la semana 2, esta fue solamente ligeramente diferente a la del placebo (por ejemplo porcentaje de cambio 16,18 % (solución 1 %) y 17,21 % (solución 3 %)) en comparación con el placebo (10,82 %). A la semana 6 no hubo ninguna clara diferencia entre los tres tratamientos (por ejemplo 18,04 % (solución 1 %), 17,18 % (solución 3 %) y 19,90 % (placebo)), pero en la semana 12 hubo una mejora adicional para el tratamiento cutáneo con las composiciones que comprendían el componente activo, que era mayor que la del placebo (por ejemplo 31,84 % (solución 1 %), 33,57 % (solución 3 %) y 16,48 % (placebo)).

Una comparación de la graduación clínica táctil/visual en ambos lados de la cara realizada al comienzo del estudio (línea basal) y después de 12 semanas de tratamiento muestra que todos los sujetos mostraron mejoras en la matidez y aspereza de la piel después del tratamiento con la composición que comprendía el polipéptido de la invención y la mayoría de los sujetos mostraron mejoras de líneas finas (97 % de los sujetos), arrugas (91 % de los sujetos), hiperpigmentación (87 % de los sujetos) y flacidez (80 % de los sujetos) (Figura 4).

Los cuestionarios revelan que desde las 6 semanas de uso se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las puntuaciones medias de indicaciones acerca de la apariencia general, la sensación general, la suavidad, la blandura, la claridad y la elasticidad entre la composición de placebo y la cosmética que comprendía el polipéptido desvelado en el presente documento.

Por lo tanto, resulta evidente a partir de los resultados anteriores que la composición que comprende la leucolectina demostró un efecto en cada aspecto de la piel envejecida en comparación con el placebo.

Ejemplo 4: método alternativo para la producción de una composición que contiene leucolectina

Las etapas iniciales del método alternativo de producción de una composición que contiene leucolectina son iguales que las descritas en el Ejemplo 1. Sin embargo, el método de producción alternativo difiere del método del Ejemplo 1 después de filtrarse el líquido de incubación usando un filtro convencional con un tamaño de poro de 7 μm , para retirar material que probablemente obstruya los filtros en etapas de filtración posteriores. En el método alternativo este filtrado, el líquido de incubación procesado, se cargó en una columna de intercambio iónico de dietilaminoetilo (DEAE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se lavó con una solución de Tris HCl 20 mM (pH 8,50). Se descartó el flujo continuo. La proteína de leucolectina se eluyó de la columna con la solución de lavado que contenía NaCl 50 mM. El eluato se recogió y después se diafiltró con un tamaño de exclusión de filtro de 8 kDa para intercambiar el tampón con agua del líquido de incubación. En este caso, el tampón fue solución salina tamponada con fosfato, aunque otros tampones son igualmente adecuados. Por ejemplo, son adecuados tampón que contiene fosfato 0,5 mM y NaCl 1 mM o tampones que contienen Tris milimolar (por ejemplo 10 mM) a un pH aproximadamente neutro o ligeramente alcalino (pH 7,5-8,5), que contiene NaCl 5 mM. El retenido de la etapa de diafiltración se recogió y se diluyó mediante la adición del tampón.

Finalmente, el filtrado se sometió a filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 μm y se recogió el filtrado final. Este filtrado es una preparación altamente enriquecida de leucolectina, que no comprende o comprende solamente cantidades traza de péptidos del líquido de incubación.

Ejemplo 5: *in vivo* de composición de leucolectina en piel envejecidaObjetivo del estudio

El objetivo de este estudio de cuidado cutáneo con doble ocultación fue evaluar las alteraciones con respecto a la hidratación cutánea y la pérdida de agua transepidérmica (PATE) en los antebrazos después de un régimen de tratamiento de 3 semanas con un gel que comprende 3 % de la preparación de leucolectina del Ejemplo 4 en relación con la situación no tratada. Además, la influencia de la leucolectina en la pigmentación de manchas de edad en las manos (contenido de melanina) y el volumen de arrugas de los ojos seleccionadas se analizaron en relación con la situación no tratada.

Material y métodos

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con el SOP "Hautpflege-Prüfung Standard", versión 4 del 29 de enero de 2003 con modificaciones en los puntos temporales de medición.

El estudio se realizó con doble ocultación en 4 sujetos femeninos. Los sujetos se clasificaron para participar en el estudio por tener piel seca en los antebrazos (valores corneométricos de línea basal <20), arrugas en los ojos en el canto lateral y manchas de edad en ambas manos. Los 4 sujetos finalizaron el estudio correcta y completamente. Los resultados de los 4 sujetos se incluyeron en el análisis de datos. Los 4 sujetos fueron de edades entre 56,3 y 70,9 años (en promedio $64,3 \pm 6,3$ años).

Los sitios de ensayo para analizar la hidratación cutánea y pérdida de agua transepidérmica (PATE) fueron ambos antebrazos. Hubo cuatro áreas de ensayo en los antebrazos, concretamente dos en cada parte interna del antebrazo. Se trataron dos áreas con el gel que comprendía la preparación de leucolectina, una se trató con glicerina (control) y la cuarta se dejó sin tratar. Se permutó la localización de los tratamientos en las áreas de ensayo.

Los sitios de ensayo para las mediciones de arrugas de los ojos fueron el área de la arruga alrededor del ojo izquierdo y derecho (canto lateral). Un lado se trató con el gel que comprendía la preparación de leucolectina, aleatoriamente, mientras que el otro lado se dejó sin tratar.

El efecto del gel que comprendía la preparación de leucolectina en la pigmentación se analizó en una mancha de edad seleccionada en cada mano. Además, una mano se trató con el gel en el dorso, aleatoriamente, mientras que la otra mano se dejó sin tratar.

Antes del inicio de las mediciones y el tratamiento hubo un periodo de preacondicionamiento de 7 días. Dentro de este periodo y durante el periodo completo del estudio, no se permitió el uso de productos de cuidado cutáneo, productos de filtro solar, productos de limpieza cutánea humectantes u oleosos y productos terapéuticos dermatológicos en los antebrazos, en el canto lateral de ambos ojos y en el dorso de ambas manos. Además, se prohibió exponer de forma intensiva los sitios de ensayo a la luz UV (sol o solarío). Los días del estudio en el instituto, se prohibió el uso del maquillaje.

Los sujetos realizaron los tratamientos dos veces al día en casa durante un periodo de tres semanas. Los productos se aplicaron en una cantidad de aproximadamente 2 mg/cm^2 en el sitio de ensayo del antebrazo correspondiente (aleatoriamente, con un sitio de ensayo dejado sin tratar y otro tratado con glicerina como control). Además, el gel que comprendía la preparación de leucolectina se aplicó al canto lateral de un lado de la cara y el dorso de una mano (izquierda o derecha, aleatoriamente), dejando el otro lado sin tratar.

Antes de iniciar la primera aplicación de producto (t_0) y después de tres semanas de tratamiento (t_1) se midieron los siguientes parámetros: hidratación cutánea del antebrazo (Corneometer CM825®, 10 mediciones repetidas); pérdida de agua transepidérmica en el antebrazo (PATE, Dermalab®, 3 mediciones repetidas); pigmentación de manchas de edad en los dorsos de las manos (Siascope®, 1 medición, contenido de melanina); y medición *in vivo* del volumen de una arruga del ojo seleccionada en el canto lateral usando el sistema de medición cutánea *in vivo* tridimensional PRIMOS® Pico (3 mediciones repetidas, volumen de la arruga en mm^3 calculado por medio de imagen en altura generada).

El cumplimiento de los sujetos con respecto a la correcta aplicación del producto se comprobó después de una semana de tratamiento con el producto.

Todas las mediciones se realizaron en una habitación de clima controlado a $21,5^\circ (\pm 1^\circ \text{C})$ y 50 % ($\pm 5\%$) de humedad relativa después de que los sujetos se hubieran adaptado con sus áreas de ensayo descubiertas a estas condiciones climáticas interiores durante al menos 30 minutos. Las mediciones y los tratamientos en el punto temporal t_1 se realizaron 10-20 horas después del último tratamiento con producto.

Abandonos

No hubo ningún abandono.

5 Reacciones cutáneas adversas de incomodidad

No hubo ninguna reacción adversa de incomodidad.

Resultados

10 La piel tratada con el gel que comprendía 3 % v/v de la preparación de leucolectina mostró un aumento de la hidratación cutánea en la media de 4 sujetos de aproximadamente 23 % en comparación con la situación no tratada después de 3 semanas de un tratamiento con producto dos veces al día (Figura 5).

15 La piel tratada con el gel mostró una reducción de la pérdida de agua transepidérmica (mejora en la función de barrera cutánea) en la media de 4 sujetos de aproximadamente 14,5 % en comparación con el sitio de ensayo no tratado después de 3 semanas de un tratamiento dos veces al día (Figura 6).

20 La piel tratada con el gel mostró una reducción del volumen de arrugas del ojo de aproximadamente 23 % en comparación con el sitio de ensayo no tratado después de 3 semanas de un tratamiento dos veces al día (Figura 7).

25 Las manchas de edad tratadas con el gel mostraron una reducción de la pigmentación (contenido de melanina) en la media de 4 sujetos de aproximadamente 10,0 % en comparación con el sitio de ensayo no tratado después de 3 semanas de un tratamiento dos veces al día (Figura 8).

Secuencias:

1. polipéptido de leucolectina de embrión de salmón:

30 MRTTAAFLVLCCLAISHAWDCQEVVNIKLMQIDAGLGQVVATDTSQIPYYLVG
DKWIRLPGSLKHITVGPAGIWGVN KDYAIKYVAGNVWQAAGLLKQLDAGGEQFIVGA
NMNDTPYCLTSSATVG YKGP GSPLPWTGLPGAVKYYSCGPF GCWAVNKNDDIYLM SL
NQDCQNK GWSHIEGKLSMIEVATDGSVFGVNSAGSVYTRDGITASKPEG TGWSNIPM
GMLMGHV TYDLGRLWWSKSAVTMVCTH

35 2. polipéptido de leucolectina de leucocitos de salmón:

SIPYYLVGDKWIRLPGSLKHITVGPAGIWGVN KDYAIKYVAGNVWQAAGLPKQ
LDAGGEQFIVGANMDDTPYCLTSSATVG YKGP GSPLPWTGLPGAVKYYSCGPF GCWA
40 VNKNDDIYLM SLNQDCQNN GWSHIEGKLSMIEVATDGSVFGVNSAGSVYTRDGITASK
PEG TGWSNIPMCM LMGHV TYDLGRLWWSKSAVTMVCTH

3. polipéptido de leucolectina 2 de salmón:

45 MRTTAAFLVLCCLAISHAWDCQEVVNIKLMQIDAGLGQVVATDTSQIPYYLVG
DKWIRLPGSLKHITVGPAGIWGVN KDYAIKYVAGNVWQAAGLLKQLDAGGNQFVGA
NMDDTPFCLTSSATVG YKGP GSPLPWTGLPGAVKYYSCGHF GCWAVNKNDDIFLMSL
NQDCQNN GWSHIDGKLSMIEVATDGSVFGVNSAGSVYTRDGITASKPEG TGWSNIPM
GMLMGHV TYDLGRLWWSKSGGTMVCTH

50 4. polipéptido de leucolectina 3 de salmón:

MGTTAAFLVLCCLAISHAWDCQEVVNIKLMQIDAGLGQWATDTSQIPYYLVG
DKWIRLPGSLKHITVGPAGIWGVN KDYAIKYVAGNVWQAAGLLKQLDAGGEQFIVGA
55 NMNDTPYCLTSSATVG YKGP GSPLPWTGLPGAVKYYSCGPF GCWAVNKNDDIYLM SL
NQDCQNK GWSHIEGKLSMIEVATDGSVFGVNSAGSVYTRDGITASKPEG TGWSNIPM
GMLMGHV TYDLGRLWWSKSAVTMVCTH

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> Aqua Bio Technology ASA

<120> Métodos para la producción de una composición cosmética que comprende leucolectina y usos de la misma

65 <130> 42.20.109734/01

<150> GB1110777.8

<151> 24-06-2011

<160>4

5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 255

10

<212> PRT

<213> *Salmo salar*

<400> 1

ES 2 651 364 T3

Met	Arg	Thr	Thr	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Ala	Ile	1	5	10	15
Ser	His	Ala	Trp	Asp	Cys	Gln	Glu	Val	Val	Asn	Ile	Lys	Asn	Leu	Met	20	25	30	
Gln	Ile	Asp	Ala	Gly	Leu	Gly	Gln	Val	Val	Ala	Thr	Asp	Thr	Ser	Gln	35	40	45	
Ile	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Val	Gly	Asp	Lys	Trp	Ile	Arg	Leu	Pro	Gly	Ser	50	55	60	
Leu	Lys	His	Ile	Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	Trp	Gly	Val	Asn	Lys	65	70	75	80
Asp	Tyr	Ala	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Val	Ala	Gly	Asn	Trp	Val	Gln	Ala	Ala	85	90	95	
Gly	Leu	Leu	Lys	Gln	Leu	Asp	Ala	Gly	Gly	Glu	Gln	Phe	Ile	Val	Gly	100	105	110	
Ala	Asn	Met	Asn	Asp	Thr	Pro	Tyr	Cys	Leu	Thr	Ser	Ser	Ala	Thr	Val	115	120	125	
Gly	Tyr	Lys	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Leu	Pro	Trp	Thr	Gly	Leu	Pro	Gly	130	135	140	
Ala	Val	Lys	Tyr	Tyr	Ser	Cys	Gly	Pro	Phe	Gly	Cys	Trp	Ala	Val	Asn	145	150	155	160
Lys	Asn	Asp	Asp	Ile	Tyr	Leu	Met	Ser	Leu	Asn	Gln	Asp	Cys	Gln	Asn	165	170	175	
Lys	Gly	Trp	Ser	His	Ile	Glu	Gly	Lys	Leu	Ser	Met	Ile	Glu	Val	Ala	180	185	190	
Thr	Asp	Gly	Ser	Val	Phe	Gly	Val	Asn	Ser	Ala	Gly	Ser	Val	Tyr	Thr	195	200	205	
Arg	Asp	Gly	Ile	Thr	Ala	Ser	Lys	Pro	Glu	Gly	Thr	Gly	Trp	Ser	Asn	210	215	220	
Ile	Pro	Met	Gly	Met	Leu	Met	Gly	His	Val	Thr	Tyr	Asp	Leu	Gly	Arg	225	230	235	240
Leu	Trp	Val	Val	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Met	Val	Cys	Thr	His		245	250	255	

ES 2 651 364 T3

<210> 2
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> *Salmo salar*

5

<400> 2

```

Ser Ile Pro Tyr Tyr Leu Val Gly Asp Lys Trp Ile Arg Leu Pro Gly
1           5           10           15

Ser Leu Lys His Ile Thr Val Gly Pro Ala Gly Ile Trp Gly Val Asn
          20           25           30

Lys Asp Tyr Ala Ile Tyr Lys Tyr Val Ala Gly Asn Trp Val Gln Ala
          35           40           45

Ala Gly Leu Pro Lys Gln Leu Asp Ala Gly Gly Glu Gln Phe Ile Val
          50           55           60

Gly Ala Asn Met Asp Asp Thr Pro Tyr Cys Leu Thr Ser Ser Ala Thr
65           70           75           80

Val Gly Tyr Lys Gly Pro Gly Ser Pro Leu Pro Trp Thr Gly Leu Pro
          85           90           95

Gly Ala Val Lys Tyr Tyr Ser Cys Gly Pro Phe Gly Cys Trp Ala Val
          100          105          110

Asn Lys Asn Asp Asp Ile Tyr Leu Met Ser Leu Asn Gln Asp Cys Gln
          115          120          125

Asn Asn Gly Trp Ser His Ile Glu Gly Lys Leu Ser Met Ile Glu Val
          130          135          140

Ala Thr Asp Gly Ser Val Phe Gly Val Asn Ser Ala Gly Ser Val Tyr
145          150          155          160

Thr Arg Asp Gly Ile Thr Ala Ser Lys Pro Glu Gly Thr Gly Trp Ser
          165          170          175

Asn Ile Pro Met Cys Met Leu Met Gly His Val Thr Tyr Asp Leu Gly
          180          185          190

Arg Leu Trp Val Val Ser Lys Ser Ala Val Thr Met Val Cys Thr His
          195          200          205
  
```

10

<210> 3
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> *Salmo salar*

ES 2 651 364 T3

<400> 3

```

Met Arg Thr Thr Ala Ala Phe Leu Leu Val Leu Cys Leu Leu Ala Ile
1          5          10          15

Ser His Ala Trp Asp Cys Gln Glu Val Val Asn Ile Lys Asn Leu Met
20          25          30

Gln Ile Asp Ala Gly Leu Gly Gln Val Val Ala Thr Asp Thr Ser Gln
35          40          45

Ile Pro Tyr Tyr Leu Val Gly Asp Lys Trp Ile Arg Leu Pro Gly Ser
50          55          60

Leu Lys His Ile Thr Val Gly Pro Ala Gly Ile Trp Gly Val Asn Lys
65          70          75          80

Asp Tyr Ala Ile Tyr Lys Tyr Val Ala Gly Asn Trp Val Gln Ala Ala
85          90          95

Gly Leu Leu Lys Gln Leu Asp Ala Gly Gly Asn Gln Phe Val Val Gly
100         105         110

Ala Asn Met Asp Asp Thr Pro Phe Cys Leu Thr Ser Ser Ala Thr Val
115         120         125

Gly Tyr Lys Gly Pro Gly Ser Pro Leu Pro Trp Thr Gly Leu Pro Gly
130         135         140

Ala Val Lys Tyr Tyr Ser Cys Gly His Phe Gly Cys Trp Ala Val Asn
145         150         155         160

Lys Asn Asp Asp Ile Phe Leu Met Ser Leu Asn Gln Asp Cys Gln Asn
165         170         175
Asn Gly Trp Ser His Ile Asp Gly Lys Leu Ser Met Ile Glu Val Ala
180         185         190

Thr Asp Gly Ser Val Phe Gly Val Asn Ser Ala Gly Ser Val Tyr Thr
195         200         205

Arg Asp Gly Ile Thr Ala Ser Lys Pro Glu Gly Thr Gly Trp Ser Asn
210         215         220

Ile Pro Met Gly Met Leu Met Gly His Val Thr Tyr Asp Leu Gly Arg
225         230         235         240

Leu Trp Val Val Ser Lys Ser Gly Gly Thr Met Val Cys Thr His
245         250         255

```

ES 2 651 364 T3

<210> 4
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> *Salmo salar*

5

<400> 4

Met	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Ala	Ile	1	5	10	15
Ser	His	Ala	Trp	Asp	Cys	Gln	Glu	Val	Val	Asn	Ile	Lys	Asn	Leu	Met	20	25	30	
Gln	Ile	Asp	Ala	Gly	Leu	Gly	Gln	Val	Val	Ala	Thr	Asp	Thr	Ser	Gln	35	40	45	
Ile	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Val	Gly	Asp	Lys	Trp	Ile	Arg	Leu	Pro	Gly	Ser	50	55	60	
Leu	Lys	His	Ile	Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	Trp	Gly	Val	Asn	Lys	65	70	75	80
Asp	Tyr	Ala	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Val	Ala	Gly	Asn	Trp	Val	Gln	Ala	Ala	85	90	95	
Gly	Leu	Leu	Lys	Gln	Leu	Asp	Ala	Gly	Gly	Glu	Gln	Phe	Ile	Val	Gly	100	105	110	
Ala	Asn	Met	Asn	Asp	Thr	Pro	Tyr	Cys	Leu	Thr	Ser	Ser	Ala	Thr	Val	115	120	125	
Gly	Tyr	Lys	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Leu	Pro	Trp	Thr	Gly	Leu	Pro	Gly	130	135	140	

ES 2 651 364 T3

Ala Val Lys Tyr Tyr Ser Cys Gly Pro Phe Gly Cys Trp Ala Val Asn
145 150 155 160

Lys Asn Asp Asp Ile Tyr Leu Met Ser Leu Asn Gln Asp Cys Gln Asn
165 170 175

Lys Gly Trp Ser His Ile Glu Gly Lys Leu Ser Met Ile Glu Val Ala
180 185 190

Thr Asp Gly Ser Val Phe Gly Val Asn Ser Ala Gly Ser Val Tyr Thr
195 200 205

Arg Asp Gly Ile Thr Ala Ser Lys Pro Glu Gly Thr Gly Trp Ser Asn
210 215 220

Ile Pro Met Gly Met Leu Met Gly His Val Thr Tyr Asp Leu Gly Arg
225 230 235 240

Leu Trp Val Val Tyr Lys Ser Ala Val Thr Met Val Cys Thr His
245 250 255

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la apariencia cosmética de piel envejecida o cicatrizada de un animal mamífero en el que:

- (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO 1-4 o una secuencia que es al menos 90 % idéntica a dicha secuencia, o una parte de cualquiera de dichas secuencias, en la que dicha parte comprende al menos 100 aminoácidos y es al menos 90 % idéntica a una región comparable de una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO 1-4; o
- (ii) una composición cosmética que comprende (i) y uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables,

se administra a dicho animal.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha composición se obtiene o puede obtenerse por un método que comprende al menos las etapas de:

- a) suspender huevos de pez en un volumen mínimo de agua, preferentemente huevos de salmón;
- b) inducir eclosión rápida, sincronizada, de dichos huevos, preferentemente de modo que la eclosión se complete en menos de 2 horas para más del 95 % de los embriones;
- c) filtrar los huevos eclosionados para obtener líquido de incubación; y
- d) filtrar el líquido de incubación para obtener la composición, en el que la etapa de filtración del líquido de incubación comprende al menos las etapas de:

- (i) filtrar el líquido de incubación usando un filtro con un tamaño de poro de al menos 5 μm y recoger el filtrado;
- (ii) filtrar el filtrado de la etapa (i) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,30-0,60 μm y recoger el filtrado;
- (iii) intercambiar el agua en el filtrado de la etapa (ii) con un tampón farmacéuticamente aceptable;
- (iv) filtrar la solución obtenida de la etapa (iii) usando un filtro con un tamaño de exclusión de al menos 80 kDa y recoger el filtrado; y
- (v) filtrar el filtrado de la etapa (iv) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 μm y recoger el filtrado, en el que dicho filtrado proporciona una composición que comprende dicho polipéptido.

3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha composición se obtiene o puede obtenerse por un método que comprende al menos las etapas de:

- a') suspender huevos de pez en un volumen mínimo de agua, preferentemente huevos de salmón;
- b') inducir la eclosión rápida, sincronizada, de dichos huevos, preferentemente de modo que la eclosión se complete en menos de 2 horas para más del 95 % de los embriones;
- c') filtrar los huevos eclosionados para obtener líquido de incubación; y
- d') filtrar el líquido de incubación para obtener la composición, en el que la etapa de filtración del líquido de incubación comprende al menos las etapas de:

- (i') filtrar el líquido de incubación usando un filtro con un tamaño de poro de al menos 5 μm y recoger el filtrado;
- (ii') someter el filtrado de la etapa (i') a cromatografía de intercambio iónico y recoger el eluato;
- (iii') intercambiar el agua en el eluato de la etapa (ii') con un tampón farmacéuticamente aceptable; y
- (iv') filtrar la solución obtenida de la etapa (iii') usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 μm y recoger el filtrado, en el que dicho filtrado proporciona una composición que comprende dicho polipéptido o parte del mismo.

4. El método de la reivindicación 3, que comprende una etapa adicional de filtrar el filtrado de la etapa (i') usando un filtro con un tamaño de poro de 0,30-0,60 μm y recoger el filtrado, preferentemente en el que la etapa (ii') comprende:

- (a) cargar el filtrado en una columna de intercambio iónico, preferentemente una columna de DEAE (dietilaminoetilo);
- (b) lavar la columna con un tampón adecuado, preferentemente una solución de lavado que comprende Tris-HCl 20 mM, pH 8,5;
- (c) eluir el polipéptido de la columna usando un tampón de elución o disolvente, preferentemente en el que el tampón de elución comprende la solución de lavado que contiene además NaCl 50 mM; y
- (d) recoger el eluato de la etapa (c).

5. El método de la reivindicación 2, en el que:

- a) el tamaño de poro del filtro en la etapa (i) es de 5-15 μm , en el que preferentemente el tamaño de poro es de 7 μm ;
- b) el tamaño de poro del filtro en la etapa (ii) es de 0,35-0,55 μm , en el que preferentemente el tamaño de poro es de 0,45 μm ;
- c) el tamaño de exclusión del filtro en la etapa (iv) es de 80-120 kDa, en el que preferentemente el tamaño de exclusión es de 100 kDa; y/o
- d) el tamaño de poro del filtro de la etapa (v) es de 0,22 μm .

6. El método de la reivindicación 3 o 4, en el que:

- a) el tamaño de poro del filtro en la etapa (i') es de 5-15 μm , en el que preferentemente el tamaño de poro es de 7 μm ;
- b) el tamaño de poro del filtro en la reivindicación 4 es de 0,35-0,55 μm , en el que preferentemente el tamaño de poro es de 0,45 μm ; y/o
- c) el tamaño de poro del filtro en la etapa (iv') es de 0,22 μm .

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que la etapa (iii) o (iii') comprende diafiltración.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la mejora comprende la reducción o prevención de la apariencia cosmética o prevalencia de arrugas, líneas finas, hiperpigmentación, laxitud, piel seca, descamación y/o pérdida de agua transepidérmica.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la piel de dicho animal se hidrata.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la mejora de la apariencia cosmética de la piel en dicho animal comprende mejorar la apariencia cosmética de una cicatriz.

11. El método de la reivindicación 10, en el que la cicatriz es como resultado de una herida o estría, preferentemente en el que la cicatriz es una cicatriz de acné o en el que la estría es *striae atrophicae*, *striae vergetures*, *striae distensae*, *striae cutis distensae*, *striae gravidarum*, *lineae atrophicae* o *linea albicante*, en el que preferentemente además la cicatriz está en el estadio de proliferación o maduración de curación cutánea, preferentemente el estadio de maduración.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho polipéptido o dicha composición cosmética es para administración tópica a la piel.

13. Una composición cosmética que puede obtenerse a partir del método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, que comprende adicionalmente la etapa de preparar dicha composición cosmética del filtrado de la etapa (v) o (iv') en el que el polipéptido o parte del mismo está presente en el intervalo de 30-50 % p/p de la masa seca de la composición.

14. Un método o composición cosmética de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho polipéptido o dicha composición cosmética se aplica, se impregna o se une químicamente en un producto, material o dispositivo.

15. Un método para aislar un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende al menos las etapas de:

- a') suspender huevos de pez en un volumen mínimo de agua, preferentemente huevos de salmón;
- b') inducir eclosión rápida, sincronizada, de dichos huevos, preferentemente de modo que la eclosión se complete en menos de 2 horas para más del 95 % de los embriones;
- c') filtrar los huevos eclosionados para obtener líquido de incubación; y
- d') filtrar el líquido de incubación para obtener el polipéptido, en el que la etapa de filtrado del líquido de incubación comprende al menos las etapas de:

(i') filtrar el líquido de incubación usando un filtro con un tamaño de poro de al menos 5 μm y recoger el filtrado;

(ii') someter el filtrado de la etapa (i') a cromatografía de intercambio iónico que comprende:

- (A) cargar el filtrado en una columna de DEAE (dietilaminoetilo);
- (B) lavar la columna con una solución de lavado que comprende Tris-HCl 10-50 mM, pH 7-9;
- (C) eluir el polipéptido de la columna usando un tampón de elución que comprende la solución de lavado que contiene además NaCl o KCl 10-500 mM; y
- (D) recoger el eluato de la etapa (c),

(iii') intercambiar el agua en el eluato de la etapa (ii') con un tampón farmacéuticamente aceptable; y
(iv') filtrar la solución obtenida de la etapa (iii') usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 μm y recoger el filtrado, en el que dicho filtrado proporciona una composición que comprende dicho polipéptido o parte del mismo, preferentemente en el que las etapas: (i'), (ii') y (vi') son como se ha definido en las reivindicaciones 4, 6 o 7.

5

Figura 1

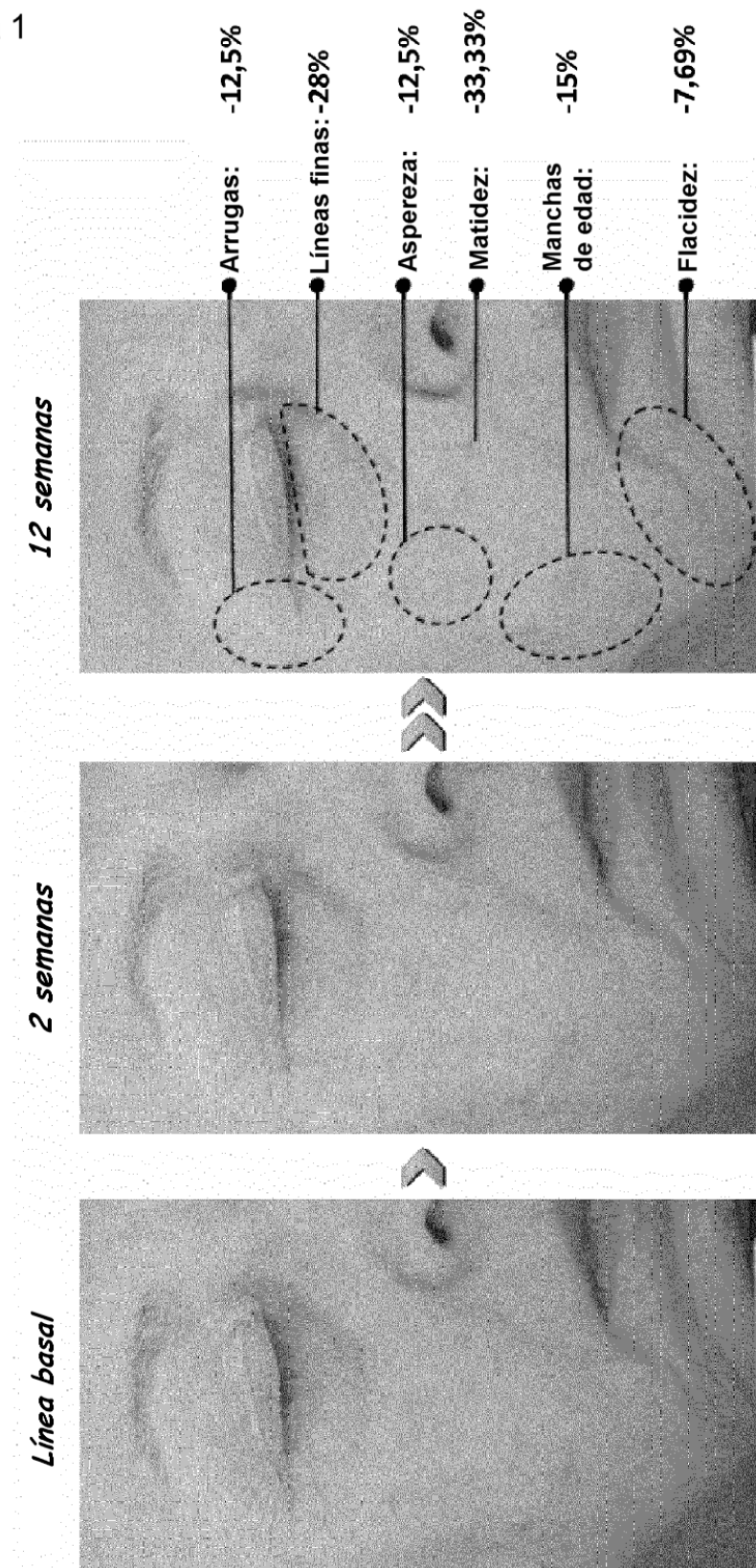


Figura 2

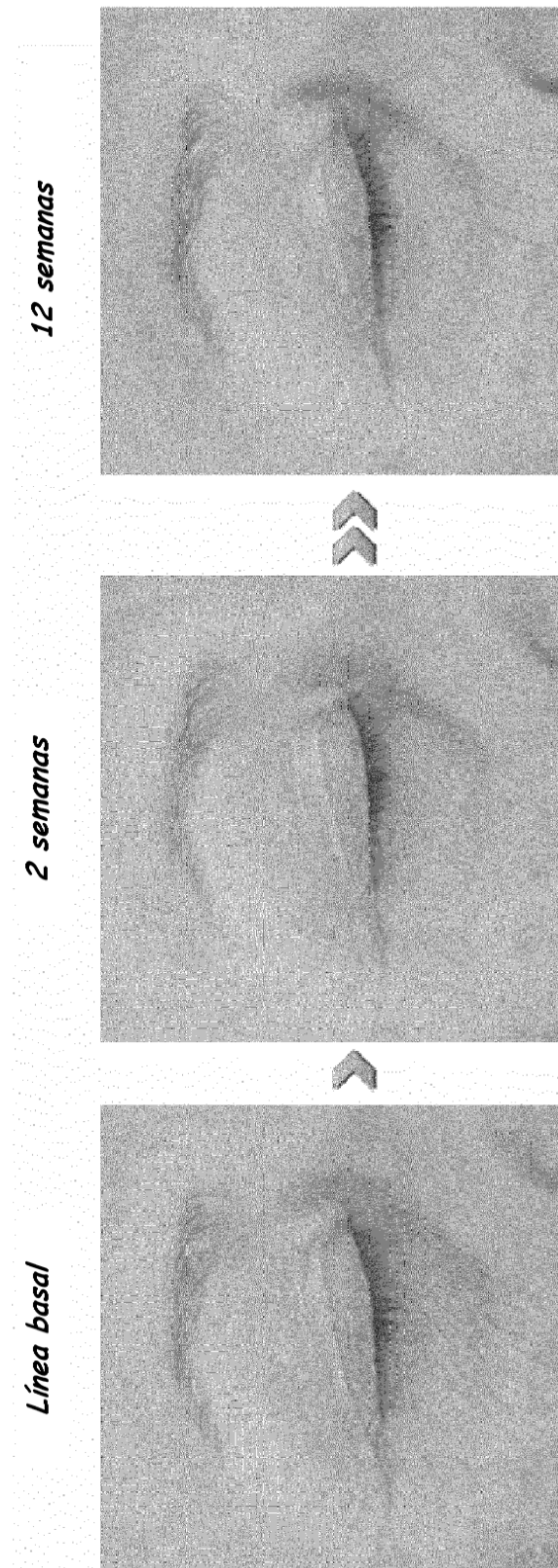


Figura 3

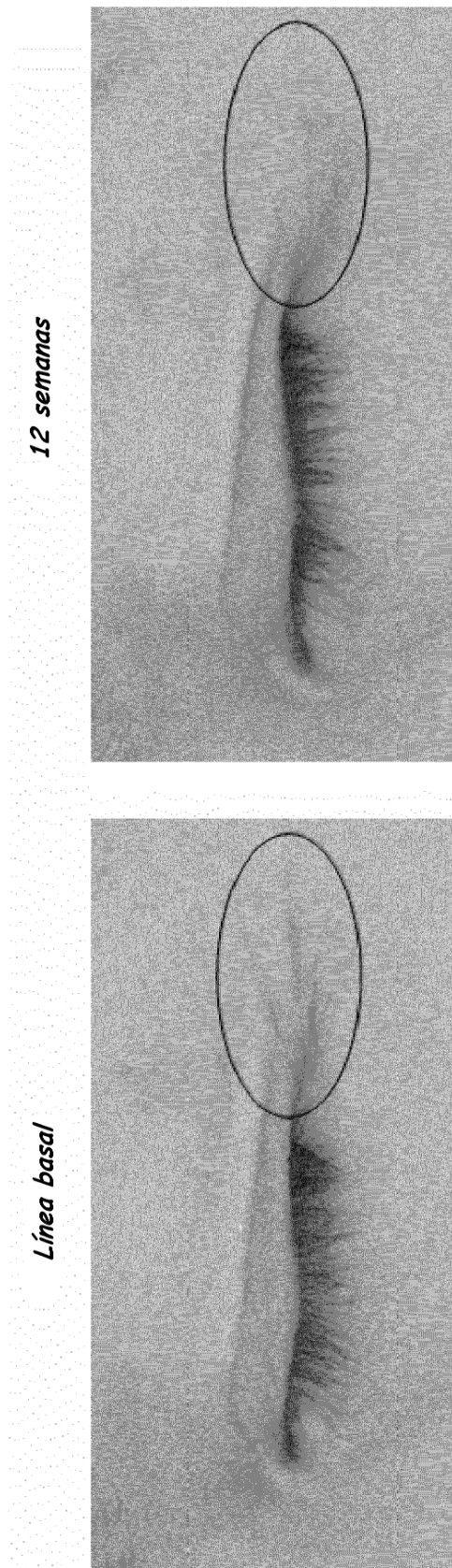


Figura 4

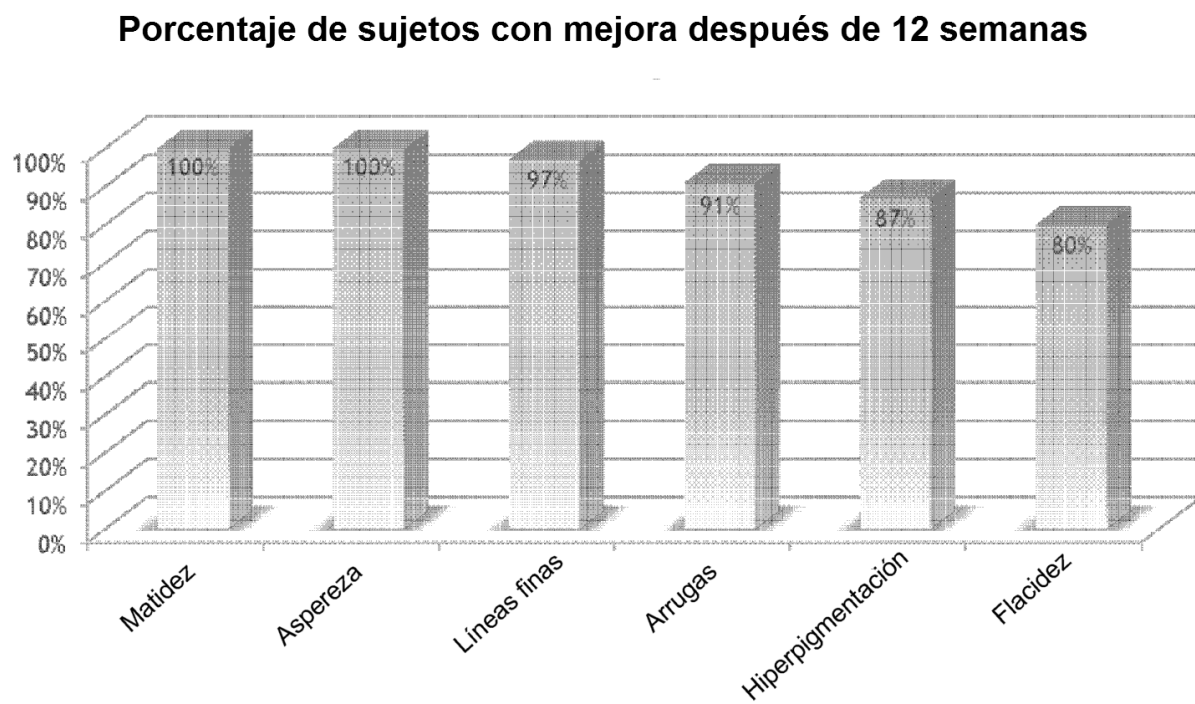


Figura 5

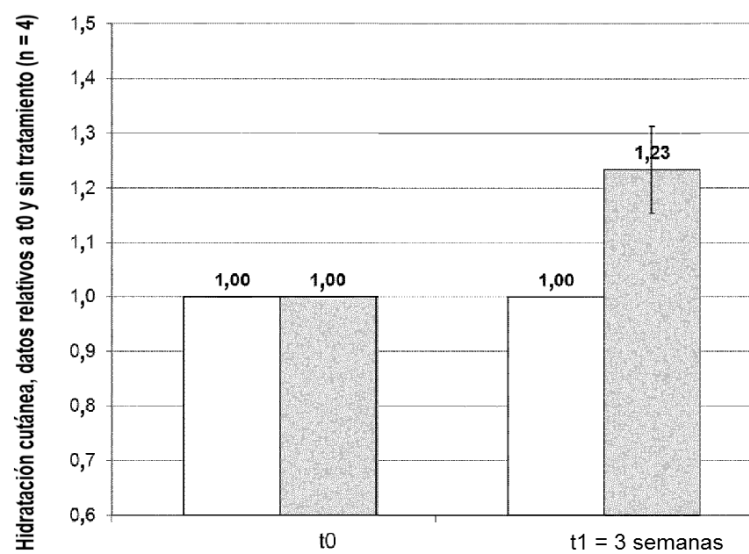
Hidratación cutánea, datos relativos a línea basal y sin tratamiento

Figura 6

Pérdida de agua transepidérmica, datos relativos a línea basal y sin tratamiento

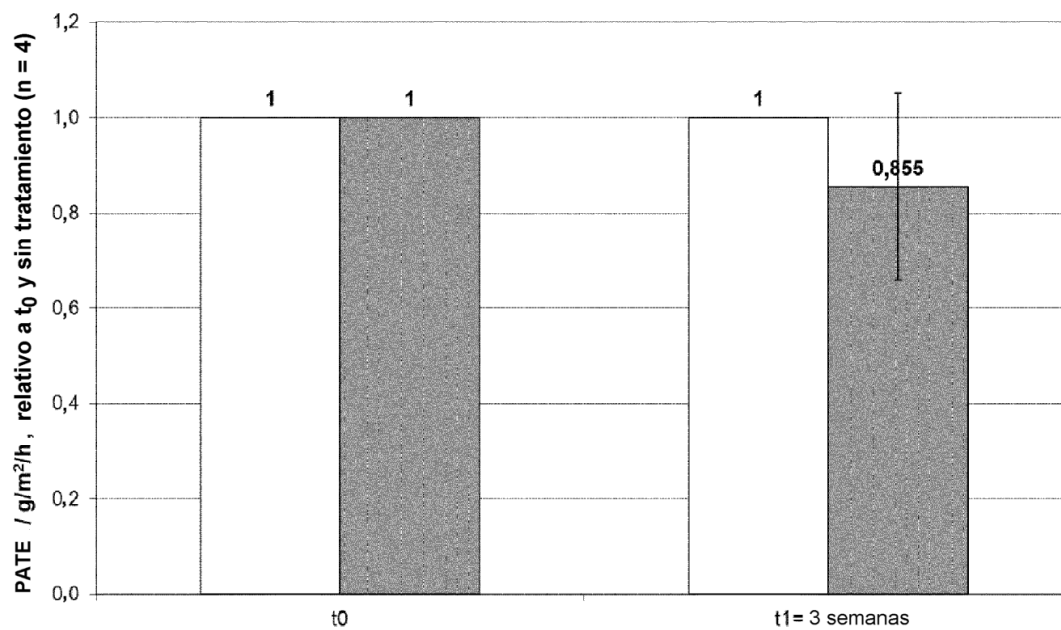


Figura 7

Volumen de arrugas de los ojos, datos relativos a línea basal y sin tratamiento

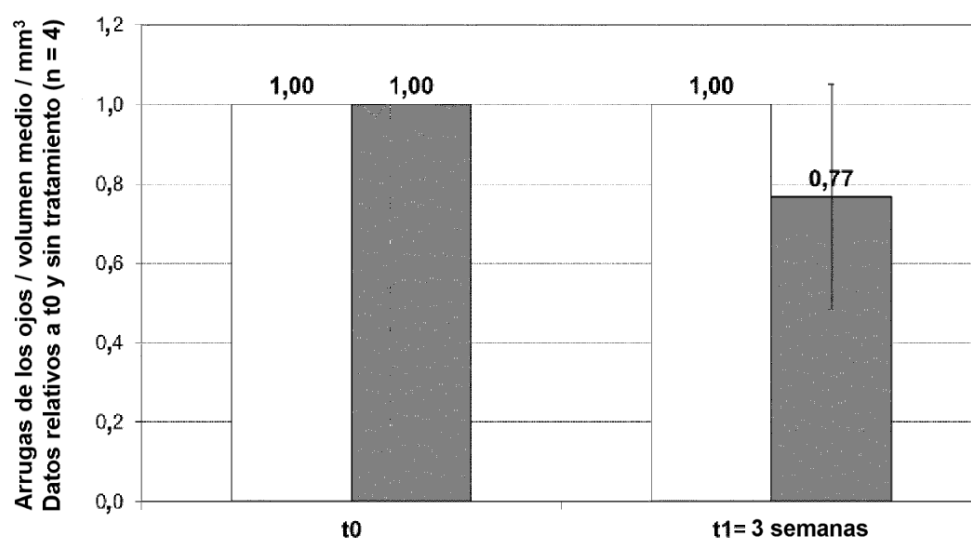


Figura 8

***Pigmentación de manchas de edad (contenido de melanina),
datos relativos a línea basal y sin tratamiento***

