

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 048**

51 Int. Cl.:

<b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/60</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/98</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/02</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2013 PCT/EP2013/077368**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096187**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2013 E 13815480 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2934700**

54 Título: **Composición cosmética de líquido de eclosión de peces, métodos para su producción y usos de la misma para mejorar la apariencia cosmética de la piel**

30 Prioridad:

**21.12.2012 GB 201223330**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.03.2018**

73 Titular/es:

**AQUA BIO TECHNOLOGY ASA (100.0%)  
Fornebuveien 42-44  
1368 Fornebu, NO**

72 Inventor/es:

**LEREN, HANS KRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 661 048 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**

Composición cosmética de líquido de eclosión de peces, métodos para su producción y usos de la misma para mejorar la apariencia cosmética de la piel

5 La presente invención se refiere a métodos para preparar una composición que comprende polipéptidos o porciones de polipéptidos, que es derivable del líquido de eclosión de peces, y su uso en diversas aplicaciones para la piel. En particular, la composición es útil para alterar, preferentemente mejorar, el aspecto cosmético de la piel envejecida.

10 La piel es uno de los órganos más vulnerables del cuerpo. La piel está en interacción constante con estímulos externos, directa o indirectamente, y con frecuencia está expuesta y se ve afectada por agentes ambientales. De hecho, la piel se puede ver como el primer punto de contacto con el mundo exterior. Esta exposición constante puede dar lugar a cambios físicos y visibles desagradables y/o no deseados en la piel, particularmente a la apariencia cosmética de la piel. Si bien dichos cambios pueden no amenazar la salud del 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 provocar estrés psicológico. Por lo tanto, existe una necesidad continua y una demanda de tratamientos efectivos para mantener, restaurar o mejorar la condición de la piel, y en particular para restaurar la apariencia juvenil de la piel.

20 La piel forma el órgano más grande del cuerpo, representa alrededor del 12-16 por ciento del peso de una persona. Realiza muchos roles vitales como barrera e influencia reguladora entre el mundo exterior y el ambiente controlado dentro de nuestros cuerpos.

25 La piel consta de 3 capas, en concreto, la epidermis, la dermis y el subcutis. 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 un epitelio escamoso estratificado, es decir, consiste en capas de células aplanadas. La piel, el cabello y las uñas están queratinizadas, lo que significa que tienen una superficie hidrofóbica muerta y endurecida formada de una proteína llamada queratina. La epidermis se vuelve impermeable debido a su contenido 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, los órganos reproductivos y otras) están principalmente no queratinizadas y húmedas. La epidermis tiene tres tipos principales de células, en concreto, queratinocitos (células de la piel), melanocitos (células productoras de pigmento) y células de Langerhans  
35 (células inmunitarias). La célula de Merkel es una cuarta célula epidérmica menos prevalente.

Los queratinocitos maduran y se diferencian con la acumulación de queratina a medida que se mueven hacia afuera. Eventualmente caen o se desprenden. Forman cuatro o cinco estratos distintos, que de los más superficiales a los más profundos son (i) el Estrato córneo (capa córnea) con células muertas, secas y sin núcleo, (ii) el Estrato  
40 granuloso (capa granular) con células que contienen gránulos basófilos y separados del estrato córneo por el delgado estrato lúcido, (iii) el Estrato espinuloso (capa de células espinosas) en la cual las células se aplastan cada vez más a medida que se mueven hacia arriba y (iv) el Estrato basal (basal capa) con células regenerativas columnares (altas).

45 Inmediatamente debajo de la epidermis está la membrana basal, una estructura especializada que se encuentra entre la epidermis y la dermis.

50 La dermis es el tejido conectivo fibroso o la capa de soporte de la piel. Las fibras principales son fibras de colágeno y elastina que se entrelazan.

El subcutis es la capa de grasa inmediatamente debajo de la dermis y la epidermis. También se llama tejido subcutáneo, hipodermis o panículo. El subcutis consiste principalmente en células grasas (adipocitos), nervios y vasos sanguíneos.

55 Se crean nuevas células epiteliales de la piel en la capa inferior de la piel, el estrato granuloso. Con el tiempo, las células migran a la superficie de la piel y se vuelven más ácidas. Durante su viaje de 30 días, mueren y se saturan de queratina. La queratina y los lípidos asociados son importantes porque protegen la piel de los elementos externos.

60 Muchos factores pueden contribuir al deterioro en la apariencia estética de la piel, incluyendo enfermedades, lesiones, factores ambientales, edad, niveles de hormonas, medicamentos, materiales aplicados o ingeridos externamente, condiciones genéticas o una combinación de estos y otros factores. El deterioro relacionado con la edad en la apariencia cosmética de la piel es un factor universal, particularmente el fotoenvejecimiento, es decir, la dermatoheliosis. Este deterioro se puede ver en irregularidades o anomalías en la piel, que pueden aparecer, por  
65 ejemplo, como piel seca, arrugas, líneas finas, aumento de la laxitud (flacidez) o pigmentación alterada.

El fotoenvejecimiento es un término utilizado para los cambios característicos inducidos por la exposición crónica a los rayos UVA y UVB. El deterioro de las funciones biológicas y la capacidad para controlar el estrés metabólico es una de las principales consecuencias del proceso de envejecimiento. El envejecimiento es un proceso complejo y progresivo que también da lugar a cambios funcionales y estéticos en la piel.

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

10 La piel seca y/o escamosa es uno de los signos más comunes del envejecimiento de la piel. Aunque ciertas personas son más susceptibles a la piel seca y/o escamosa, la apariencia de piel seca y/o descamada puede afectar a cualquier persona, independientemente de su edad, sexo o tipo de piel.

15 La piel seca ocurre cuando la capa externa de la piel (el estrato córneo con el estrato lúcido) se queda sin agua, es decir, a través de la pérdida de agua trans-epidérmica (PATE). Cuando esta capa está bien humedecida, minimiza la pérdida de agua a través de la piel y ayuda a evitar irritantes, alérgenos y gérmenes. Sin embargo, cuando el estrato córneo se seca, su función protectora se reduce. Esto permite una mayor pérdida de agua, dejando la piel vulnerable a los factores ambientales.

20 Idealmente, el estrato córneo tiene un contenido de agua del 10 % al 30 %. Esta agua imparte a la piel su textura suave, lisa y flexible, es decir, las características asociadas con la apariencia juvenil de la piel. El agua proviene de la atmósfera, las capas subyacentes de la piel y el sudor. El aceite producido por las glándulas de la piel y las sustancias grasas producidas por las células de la piel actúan como humectantes naturales, lo que permite que el estrato córneo se adhiera al agua.

25 El cuerpo pierde continuamente agua de la superficie de la piel por evaporación (PATE). En condiciones normales, la tasa de pérdida es lenta y el agua se reemplaza adecuadamente. Los signos y síntomas característicos de la piel seca ocurren cuando la pérdida de agua supera el reemplazo del agua, y el contenido de agua del estrato córneo cae por debajo del 10 %.

30 Los humectantes que mejoran o erradican la piel seca y/o escamosa, mejorando de este modo la apariencia cosmética de la piel, son muy deseables. Aunque muchos humectantes son conocidos en la técnica, sigue existiendo la necesidad de productos naturales que sean efectivos pero a la vez suaves.

35 Las células epidérmicas que exhiben una pigmentación indeseada o excesiva, es decir, hiperpigmentación, por ejemplo, manchas hepáticas, es otro signo común del envejecimiento de la piel. Tradicionalmente, puede usarse la exfoliación para eliminar las células epidérmicas que son perjudiciales para la apariencia cosmética de la piel.

40 La exfoliación elimina los estratos externos de la epidermis para revelar las células de la piel más nueva debajo. La exfoliación puede lograrse 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 frutas, ácido cítrico o ácido málico y pueden ser aplicados a altas concentraciones por un dermatólogo, o a concentraciones más bajas en productos de venta libre. La exfoliación química puede implicar el uso de productos que contienen alfa hidroxiácidos (AHA) o beta hidroxiácidos (BHA) o enzimas que actúan para aflojar las sustancias similares al pegamento que mantienen unidas las células en las uniones celulares, lo que les permite liberarlas. Este tipo de exfoliación se recomienda para las personas que traten el acné.

45 La mayor desventaja de la exfoliación es el alto precio de algunos de los productos y métodos utilizados para lograrlo. La exfoliación dará lugar a un cierto enrojecimiento inicial de la piel. Cerca del final de la exfoliación química, la piel se quemará, con colores que varían de un blanco brillante a gris en la superficie de la piel.

50 Por lo tanto, son deseables los métodos efectivos para reducir la hiperpigmentación de la piel, que sean más suaves sobre la piel que la exfoliación.

55 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de productos y tratamientos adecuados para promover el aspecto estético de la piel. En otras palabras, son deseables productos y métodos para mejorar la apariencia cosmética de la piel. En particular, existe una demanda de productos y métodos para restaurar la apariencia juvenil de la piel envejecida y/o combatir los signos del envejecimiento de la piel.

60 Ahora se ha descubierto sorprendentemente que una composición que comprende moléculas, concretamente polipéptidos o porciones de polipéptidos, que se encuentran en el líquido de eclosión de peces, es notablemente eficaz para mejorar la apariencia cosmética de la piel, particularmente reduciendo los signos o síntomas físicos asociados con la piel envejecida.

65

La eclosión de embriones de organismos vertebrados ovíparos, por ejemplo peces, anfibios, aves y reptiles, se ve facilitada por diversas enzimas, normalmente conocidas como enzimas de eclosión, que son capaces de degradar parcial o totalmente las partes proteicas de la cáscara del huevo. Los ovocitos de todos los vertebrados tienen envolturas extracelulares características, conocidas como envolturas vitelinas, cáscaras de huevo o corion (usados indistintamente en este documento), que están constituidos por la reticulación de varios polipéptidos. Proteasas con diferentes especificidades actúan sobre el corion para ablandar, erosionar y/o deshacer (es decir, degradar) la cáscara de huevo y facilitar la liberación del embrión. Por lo tanto, el fluido liberado del huevo durante el proceso de eclosión y/o el fluido en el que nace el embrión (es decir, el líquido de eclosión) comprende una multitud de polipéptidos y porciones de polipéptidos, es decir, productos de degradación.

Ya se han aislado las enzimas del líquido de eclosión y se han usado en aplicaciones cosméticas sobre la piel (documentos WO2011/064384, WO2010/049688). Se ha encontrado sorprendentemente que las composiciones que comprenden proteínas y porciones de polipéptidos, que se derivan del líquido de eclosión de salmónidos, tienen efectos pronunciados sobre el aspecto cosmético de la piel (documentos WO2012/175742, WO2012/175743). Sin querer limitarse a la teoría, los datos de la presente solicitud demuestran que las composiciones que comprenden los polipéptidos de salmónidos y las porciones de polipéptidos son capaces de restaurar la apariencia juvenil de la piel. El líquido de eclosión de otros peces contiene polipéptidos que son funcionalmente equivalentes a los polipéptidos encontrados en el líquido de eclosión de salmónidos. Se cree que la combinación de polipéptidos y porciones de polipéptidos en las composiciones definidas en la presente memoria (que se cree que comprenden al menos 50 polipéptidos o porciones de polipéptidos diferentes) puede interactuar con diferentes tipos de proteínas presentes en la dermis y epidermis de la piel. Se cree que la combinación de polipéptidos y porciones de polipéptidos puede funcionar en sinergia y que estas interacciones pueden ser, al menos en parte, responsables de los efectos de la composición sobre el aspecto estético/estético de la piel.

Por consiguiente, en su forma más amplia, se puede ver que la invención proporciona una composición que comprende polipéptidos y porciones de polipéptidos derivables del líquido de eclosión de peces, en el que la composición no se obtiene ni puede obtenerse a partir del líquido de eclosión de salmónidos. En particular, la composición es para su uso en o en métodos para promover la apariencia estética de la piel. En otras palabras, la composición como se describe en este documento es para su uso en o en métodos para mejorar la apariencia cosmética de la piel. En un aspecto particularmente preferido, se puede ver que la invención proporciona una composición que comprende polipéptidos y porciones de polipéptidos derivables del líquido de eclosión de peces, excepto del líquido de eclosión de salmónidos, como se describe en este documento para su uso en o en métodos para restaurar la apariencia juvenil a edad piel y/o combatir los signos del envejecimiento de la piel. La composición referida anteriormente también se denomina en este documento "extracto de líquido de eclosión". Además de polipéptidos y porciones de polipéptidos, dicho extracto puede comprender material nativo no proteico.

Será evidente a partir de las descripciones siguientes que una composición que comprende polipéptidos y porciones de polipéptidos derivables del líquido de eclosión de peces, que no se obtiene ni se puede obtener (es decir, se deriva) del líquido de eclosión de salmónidos, como se describe en este documento, se puede proporcionar como una composición cosmética, que comprende uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La invención está definida por las reivindicaciones. En un aspecto de la presente invención nosotros describimos un método para preparar una composición cosmética como se describe en el presente documento a partir de un líquido de eclosión de peces, en el que dicho líquido de eclosión no es un líquido de eclosión de salmónidos, que consta al menos de las etapas de:

- a) suspender huevos de pescado, en el que dichos huevos no son huevos de salmónidos, en un volumen mínimo de agua (por ejemplo, equivalente al volumen de los huevos o menos);
- b) inducir la eclosión rápida y sincronizada de dichos huevos (preferentemente de manera que la eclosión se complete en menos de 6 horas para más del 80 % de los embriones);
- c) opcionalmente filtrar los huevos eclosionados para obtener el líquido de eclosión; y
- d) filtrar el líquido de eclosión de b) o c) para obtener la composición, en el que la etapa de filtrar el líquido de eclosión comprende al menos las etapas de:

- (i) filtrar el líquido de eclosión usando un filtro con un tamaño de poro de al menos 5  $\mu\text{m}$ , preferentemente 5-15  $\mu\text{m}$ , y de forma particularmente preferible un tamaño de poro de 7  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$ , preferentemente un tamaño de poro de 0,35-0,55  $\mu\text{m}$ , de forma particularmente preferible de 0,40-0,50  $\mu\text{m}$ , lo más preferentemente de 0,45  $\mu\text{m}$ , y recoger el filtrado;
- (iii) intercambiar el agua en el filtrado de la etapa (ii) con un tampón farmacéutica o cosméticamente aceptable;
- (iv) filtrar la solución obtenida de la etapa (iii) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30  $\mu\text{m}$ , preferentemente un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  y recoger el filtrado; y
- (v) preparar dicha composición cosmética a partir del filtrado de la etapa (iv).

Como se menciona en la presente memoria, "líquido de eclosión" es el fluido liberado de los huevos durante el proceso de eclosión y puede estar en forma cruda, diluida o filtrada. El líquido de eclosión crudo se refiere a fluido no

diluido sin tratar. El líquido de eclosión diluido se refiere al líquido de eclosión que puede haberse mezclado con otro fluido durante o después de la eclosión.

5 La presente invención también proporciona una composición cosmética obtenida u obtenible mediante el método definido en la reivindicación 11. La etapa de intercambio del agua en el filtrado 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 con un filtro de un tamaño de exclusión de menos de 15 kDa, preferentemente de 10 kDa o menos, por ejemplo 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 kDa o menos.

10 La diafiltración usa membranas de ultrafiltración para eliminar, por ejemplo, sales u otros microsolutos no deseados o indeseables de una solución o como forma de intercambio del disolvente, por ejemplo, el tampón, de una solución. Las moléculas pequeñas se separan de una solución mientras que retienen moléculas más grandes en el retenido (el material que no pasa a través del filtro). Los microsolutos y disolventes, por ejemplo, el agua, generalmente se lavan fácilmente a través de la membrana. Normalmente, alrededor de 3 volúmenes de disolvente de diafiltración  
15 (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) eliminarán el 95 % de los microsolutos. Por lo tanto, el filtrado anterior de la etapa (ii) se procesa inicialmente mediante diafiltración y esto da como resultado la concentración del retenido como una proporción de la solución (que contiene las impurezas solubles/fracción no deseada del líquido de eclosión) que pasa a través de la membrana. El producto retenido se diluye a continuación con un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, fosfato sódico 0,5 mM y cloruro sódico 1 mM, solución salina tamponada  
20 con fosfato, etc. El producto retenido diluido se puede someter a rondas repetidas de diafiltración, si es necesario.

Normalmente, antes de la etapa (iv), el retenido se diluye de manera que el filtrado de la etapa (iv) tenga una actividad enzimática de 3000-5000 mU/l, preferentemente de 3000-4000 mU/l y lo más preferentemente de aproximadamente 3400 mU/l. La actividad enzimática del filtrado puede medirse por la capacidad del filtrado para  
25 escindir el sustrato cromogénico del Factor Xa ( $\text{CH}_3\text{OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH}$ , número de producto Sigma Aldrich: F3301-25MG). Antes de la etapa de diafiltración, el líquido de eclosión puede comprender una actividad enzimática en el intervalo de 10 a 150.000 mU/l. Una unidad (1 U) se puede definir como la cantidad de enzima requerida para catalizar la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto.

30 El sustrato cromogénico del Factor Xa (Sigma-Aldrich) se escinde mediante una enzima presente en el líquido de eclosión produciendo un producto amarillo que se puede medir convenientemente usando análisis espectrofotométrico a una longitud de onda de 405 nm. Un ensayo típico comprende la adición de 100  $\mu\text{l}$  de solución de líquido de eclosión, obtenible de la etapa (iii) del método anterior, a 600  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato, que comprende 10  $\mu\text{l}$  de sustrato cromogénico Factor Xa (10 mg/ml en agua mili-Q o agua destilada), 70  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl  
35 0,2 M a pH 8,5 y 520  $\mu\text{l}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ . Convenientemente, el cambio en la absorbancia se puede medir durante 5-20 minutos (o hasta una hora para muestras con baja actividad enzimática), normalmente durante 10 minutos. El resultado se multiplica con un factor apropiado, por ejemplo, 10 (para un ensayo de 10 minutos) para obtener la actividad de la enzima por 1 ml de muestra. Se pueden usar otros sustratos apropiados y equivalentes para determinar la actividad del líquido de eclosión.

40 Como se menciona anteriormente, en algunas realizaciones puede ser ventajoso sincronizar la etapa de eclosión del huevo para maximizar la cantidad de líquido de eclosión obtenido, particularmente la cantidad de los polipéptidos deseados o porciones de los mismos en el líquido de eclosión, para su purificación. La eclosión sincronizada se puede lograr mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, algunos huevos se pueden sincronizar usando foto-manipulación, por ejemplo, transfiriendo huevos desde una zona con luz (que inhibe la eclosión) a condiciones sin luz. También puede usarse la manipulación de la temperatura de los huevos, por ejemplo, la temperatura de la solución en la que nacen los huevos, la desoxigenación del ambiente de eclosión, por ejemplo, la desoxigenación de la solución en la que eclosionan los huevos (Oppen-Berntsen et al., 1990, Aquaculture, 86, pp. 417-430), aumentando la cantidad de dióxido de carbono en el entorno de eclosión, y la estimulación de los huevos usando electricidad para provocar una eclosión sincronizada. En algunas realizaciones, la eclosión sincronizada se puede lograr usando feromonas, por ejemplo, feromonas peptídicas capaces de afectar, es decir, estimular, el desarrollo embrionario y la eclosión. Como se ha indicado anteriormente, los huevos pueden suspenderse en un volumen mínimo de agua, que puede ser equivalente al volumen de huevos o menos, por ejemplo, por cada 1 ml de huevos se puede usar un líquido de suspensión de 1, 0,75, 0,5, 0,25 ml, por ejemplo, de  
50 0,5 a 1 ml. En realizaciones preferidas, la eclosión rápida y sincronizada de dichos huevos es tal que la eclosión se completa en menos de 6 horas para más del 80 % de los embriones. En realizaciones particularmente preferidas, la eclosión se completa en menos de 5, 4, 3 o 2 horas, tal como 0,5-6 horas, 1-5 horas, 1,5-4 horas, 2-3 horas, por ejemplo, 1-2 horas. Además, en algunas realizaciones, la eclosión se completa dentro de los periodos indicados anteriormente para más del 85 %, 90 % o 95 % de los embriones, por ejemplo, más del 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,  
55 97, 98 o 99 % de los embriones. Puede ser ventajoso diluir el líquido de eclosión para facilitar las etapas de purificación posteriores, por ejemplo, para reducir la viscosidad del líquido de eclosión. Por lo tanto, el método puede comprender una etapa adicional de dilución del líquido de eclosión antes de la etapa (d). Preferentemente, el filtrado puede diluirse en un factor de al menos 0,1, 0,2, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 1000, 5000 o 10.000.

65

El método para preparar una composición cosmética descrita anteriormente da como resultado una preparación enriquecida que preferentemente está sustancialmente libre de cualquier componente contaminante derivado del material o material fuente utilizado en el procedimiento de aislamiento, por ejemplo, componentes distintos de los polipéptidos o porciones de polipéptidos comprendidos en el líquido de eclosión crudo. En una realización preferida, la composición puede enriquecerse hasta un grado de pureza de más del 30, 40, 50 o 60 %, por ejemplo, > 70, 80 o 90 % de pureza tal como se evalúa en p/p (peso seco) de los polipéptidos y porciones de polipéptidos en comparación con el líquido de eclosión de partida, es decir, una pureza del 90 % se refiere a una pérdida del 90 % del material de partida (componentes contaminantes) durante el transcurso del método de preparación. Sin embargo, se pueden usar composiciones que tienen una pureza menor, por ejemplo, retienen más del 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % del material de partida.

Aunque el filtrado puede formar por sí mismo la composición cosmética, opcionalmente el producto (el filtrado de la etapa (iv)) obtenido u obtenible del método anterior puede diluirse (o concentrarse) a una concentración apropiada para producir la composición cosmética y/o antes de su uso en los métodos y usos de la invención en la etapa (v). Por lo tanto, el método puede 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 10.000. En particular preferentemente, la composición final comprende el 0,5-10 %, por ejemplo, el 0,5-5 %, preferentemente el 0,5-3 % (por ejemplo, el 1 o 3 %) del filtrado de la etapa (iv). En una realización particularmente preferida, la solución de la etapa (iii) del método anterior se diluye o se concentra para lograr una solución con una actividad enzimática de 1000-10.000 mU/l, medida por el método descrito anteriormente. Preferentemente, la solución, y por lo tanto el filtrado de la etapa (iv) comprende una actividad de 2000-10.000, 3000-9000, 3000-7000, 3000-6000, 3000-5000 o 3000-4000 mU/l. Más preferentemente, la solución comprende una actividad de aproximadamente 3400 mU/l.

Opcionalmente, se pueden añadir uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables al producto obtenido u obtenible a partir del método anterior. Por lo tanto, el método puede 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 durante la etapa (v). Las etapas alternativas o adicionales del método de preparación incluyen cambiar o modificar el disolvente, por ejemplo, el pH, la concentración de iones, etc.

Se pueden añadir otros componentes o ingredientes farmacéuticamente aceptables al producto obtenido u obtenible a partir del método anterior, por ejemplo, durante la etapa (v). El uno o más componentes adicionales pueden ser componentes activos, es decir, componentes que tienen un efecto sobre la piel, preferentemente que también actúan para promover el aspecto estético de la piel o mejorar el aspecto cosmético de la piel, por ejemplo, en las indicaciones cosméticas descritas en este documento. De este modo, alternativa o adicionalmente, el método puede 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 en la etapa (v). Los componentes activos farmacéuticamente aceptables pueden incluir minerales, vitaminas, enzimas, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, antioxidantes, polisacáridos, sustancias adecuadas como filtros solares, exfoliantes químicos, extractos y mezclas de los mismos, como se describe en más detalle a continuación.

La composición cosmética obtenida u obtenible a partir de los métodos anteriores es adecuada para su uso en los métodos de la invención, como se describe en otra parte del presente documento. En particular, la composición cosmética se usa para mejorar el aspecto cosmético de la piel en un animal mamífero.

La invención también proporciona un método para mejorar el aspecto cosmético de la piel de un animal mamífero en el que se administra una composición cosmética tal como se ha definido anteriormente a dicho animal.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de una composición cosmética como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para mejorar el aspecto cosmético de la piel de un animal mamífero.

Los "polipéptidos" como se denominan en este documento son moléculas con preferentemente más de 50, 100, 150, 200 o 250 restos y/o menos de 500, 400, 300, 200 o 100 restos o un intervalo seleccionado a partir de los mismos. Como se menciona en este documento, una "porción" preferentemente comprende al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 o más aminoácidos de la secuencia de la que se deriva. Dicha porción se puede obtener a partir de porciones centrales o N-terminales o C-terminales de la secuencia.

Las composiciones como se definen en este documento pueden obtenerse de cualquier huevo de peces excepto de huevos de salmónidos, es decir, las composiciones de la presente invención no se obtienen ni pueden obtenerse de huevos de salmónidos, por ejemplo, huevos de las subfamilias Salmo y Oncorhynchus, como el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) o salmón del Pacífico (*Oncorhynchus masou*). En general, los peces ponen huevos que experimentan poco o ningún otro desarrollo embrionario dentro de la madre y por lo tanto los huevos de peces representan una fuente útil de líquido de eclosión a partir de la cual puede obtenerse la composición cosmética de la invención o puede obtenerse mediante el método descrito en este documento. En consecuencia, los peces adecuados que

pueden proporcionar huevos como material de partida para los métodos de la invención incluyen cualquier pez de la infraclase Teleostei, que es una de las tres infraclases de la clase Actinopterygii, excepto peces de la familia Salmonidae. Por lo tanto, los peces se pueden seleccionar entre un pez de cualquier superorden seleccionado de la lista que consiste en Osteoglossomorpha, Elopomorpha, Clupeomorpha, Ostariophysi, Protacanthopterygii (excluyendo peces de la familia Salmonidae), Stenopterygii, Cyclosquamata, Scopelomorpha, Lampridiomorpha, Polymyxiorpha, Paracanthopterygii y Acanthopterygii.

En algunas realizaciones, los peces se pueden seleccionar entre un pez de cualquier orden seleccionado de la lista que consiste en Osteoglossiformes, Hiodontiformes, Elopiformes, Albuliformes, Notacanthiformes, Anguilliformes, Saccopharyngiformes, Clupeiformes, Gonorynchiformes, Cypriniformes, Characiformes, Gymnotiformes, Siluriformes, Argentiniformes, Salmoniformes (excluyendo peces de la familia Salmonidae), Esociformes, Osmeriformes, Ateleopodiformes, Stomiiformes, Aulopiformes, Myctophiformes, Lampriformes, Polymixiiformes, Percopsiformes, Batrachoidiformes, Lophiiformes, Gadiformes, Ophidiiformes, Mugiliformes, Atheriniformes, Beloniformes, Cetomimiformes, Cyprinodontiformes, Stephanoberyciformes, Beryciformes, Zeiformes, Gobiesociformes, Gasterosteiformes, Syngnathiformes, Synbranchiformes, Tetraodontiformes, Pleuronectiformes, Scorpaeniformes, Perciformes y Acipenseriformes.

En realizaciones preferidas, los peces se pueden seleccionar entre un pez de cualquier orden seleccionado de la lista que consiste en Salmoniformes (excluyendo peces de la familia Salmonidae), Cypriniformes, Perciformes, Siluriformes, Mugiliformes y Acipenseriformes.

En realizaciones particularmente preferidas, los peces se pueden seleccionar entre un pez de cualquier Familia seleccionada de la lista que consiste en Cyprinidae, Cichlidae, Pangasiidae, Sciaenidae, Serranidae, Carangidae, Sparidae, Lateolabracidae, Moronidae, Mugilidae, Oryziinae, Latidae, Eleotridae y Acipenseridae.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el pez puede ser un pez de lengua huesuda, un Mooneye, un Goldeye, un malacho, un sábalo, un macabijo, un halosáurido, una anguila espinosa, una verdadera anguila, un pez pelicano, una anguila gulper, un arenque, la anchoa, el salmonete, el barbo, la carpa, el danio, el pez de colores, la loa, el mené, la rásbora, la characina, el pez lápiz, el pez hacha, la piraña, el tetra, la anguila eléctrica, el pez cuchillo, el bagre, el pez duende, los alepocefálicos, el lucio, el eperlano, los galáxidos, los ateleopodiformes, los peces luminosos, pez espada marino, el pez pato de Bombay, la lanceta, el pez linterna, los peces sable, los Lampris, los listoncillos, el pez barbudo, los peces de las cavernas, una perca de trucha, un pez sapo, un rape, un bacalao, un pez perlero, un arowana de plata, un salmonete, un pejerrey, un pez arcoiris, un pez volador, un pez ballena, vivíparos de acuario, un killis, una cumbreira, un pez de colmillos largos, un pez pinzón, un pez dragón, un pez sargo, un pez espinoso, un pez aguja, un caballito de mar, una anguila de pantano, un pez limoncillo, un pez globo, una platija, un pez escorpión, una Cottoidea, un anabantida, un róbalo, un cíclido, un gobio, un gurami, una caballa, una perca, un pez moteado, una pescadilla o un lábrido.

En formas de realización particularmente preferidas, los peces pueden ser cualquier especie seleccionada entre carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), Catla (*Catla catla*), carpa común (*Cyprinus carpio*), carpa cabeza (*Hypophthalmichthys nobilis*), carpa cruciana (*Carassius carassius*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus niloticus*), bagre panga (*Pangasius pangasius*), Roho labeo (*Labeo rohita*), corvina amarilla grande (*Larimichthys crocea*), mero graso (*Epinephelus tauvina*), medregal japonés (*Seriola quinqueradiata*), dorada (*Sparus aurata*), lubina japonesa (*Lateolabrax japonicus*), lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), dorada del Pacífico (*Chrysophrys auratus*), salmonete de cabeza plana (*Mugil cephalus*), Barramundi (*Lates calcarifer*), gobio de mármol (*Oxyeleotris marmorata*), tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), pez de arroz japonés (*Orzias latipes*), pez cebra (*Danio rerio*), esturión de Siberia (*Acipenser baerii*) y esturión del Danubio (*Acipenser gueldenstaedtii*).

En algunas realizaciones, las composiciones cosméticas pueden obtenerse a partir de líquido de eclosión de más de un tipo de huevo, es decir, huevos de más de un tipo de pez. Por ejemplo, el líquido de eclosión de dos o más tipos de huevos podría usarse en el método descrito en este documento para obtener la composición cosmética de la invención. Por lo tanto, el método de la invención puede incluir una etapa de combinar el líquido de eclosión recogido de los huevos eclosionados de uno o más peces, por ejemplo, antes o después de la filtración. Por lo tanto, los huevos de los peces descritos en este documento pueden verse como variaciones biológicas naturales del material de partida.

Las composiciones cosméticas descritas en este documento son para su uso in vivo como se describe en el presente documento.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "fisiológicamente aceptable" o "cosméticamente aceptable" se entiende que el ingrediente debe ser adecuado para su aplicación y para composiciones cosméticas. Los ingredientes también deben ser compatibles con otros ingredientes en la composición y fisiológicamente aceptables para el receptor.

El ingrediente activo, es decir, la composición que puede obtenerse mediante el método descrito anteriormente, para su administración puede modificarse apropiadamente para su uso en una composición cosmética. Por ejemplo, la

composición utilizada de acuerdo con la invención puede estabilizarse contra la degradación, por ejemplo, mediante el uso de aditivos apropiados tales como sales o tampones no electrolíticos, acetato, SDS, EDTA, citrato o acetato, manitol, glicina, HSA o polisorbato.

5 Las composiciones obtenidas mediante los métodos descritos en este documento pueden estar presentes en las composiciones para los usos cosméticos como único ingrediente activo o pueden combinarse con otros ingredientes, particularmente otros ingredientes activos, por ejemplo, para aumentar el efecto cosmético (como se describe anteriormente) o para hacer la composición más atractiva para el consumidor. En algunas realizaciones, pueden combinarse composiciones obtenidas por los métodos de la invención que se derivan de diferentes fuentes de líquido de eclosión.

10 Como se menciona anteriormente, las composiciones descritas en este documento exhiben propiedades que son útiles para mejorar el aspecto cosmético de la piel, particularmente de la piel envejecida, por ejemplo, piel fotoenvejecida.

15 La composición descrita en la presente memoria también puede comprender impurezas, por ejemplo, después de la preparación de dicha composición a partir de una de las fuentes naturales descritas anteriormente. En las composiciones como se describen en este documento, los diversos polipéptidos o porciones de polipéptidos derivables del líquido de eclosión de peces pueden estar presentes (en combinación) en el intervalo de 0,0001 a 50 % en p/p de la composición cosmética preparada de acuerdo con el método descrito anteriormente. Preferentemente, dichos polipéptidos o porciones de polipéptidos derivables de líquido de eclosión de peces están presentes (en combinación) en un intervalo del 0,0001 al 10 % en p/p de la composición cosmética (o hasta el 10-40 %), por ejemplo, del 0,0001 al 5 %, del 0,0001 al 3 %, del 0,0001 al 2 %, del 0,0001 al 1 %, del 0,0001 al 0,5 %, del 0,0001 al 0,1 % en p/p de la composición cosmética preparada de acuerdo con el método anterior (por ejemplo, del 0,01 al 0,1 % en p/p o del 0,0001 al 0,001 % en p/p si se diluye en la etapa final). Por consiguiente, los polipéptidos individuales o porciones de polipéptidos derivables del líquido de eclosión de peces pueden estar presentes en el intervalo del  $1 \times 10^{-6}$  al 10 % en p/p de la composición cosmética. En algunas realizaciones, dichos polipéptidos individuales o porciones de polipéptidos derivables del líquido de eclosión de peces pueden estar presentes en el intervalo del  $1 \times 10^{-6}$  al 5 % en p/p de la composición cosmética, por ejemplo del  $1 \times 10^{-6}$  al 4 %, del  $1 \times 10^{-6}$  al 3 %, del  $1 \times 10^{-6}$  al 2 %, del  $1 \times 10^{-6}$  al 1 %, del  $1 \times 10^{-6}$  al 0,5 %, del  $1 \times 10^{-6}$  al 0,1 % o del  $1 \times 10^{-6}$  al 0,01 % en p/p de la composición cosmética si no se diluye adicionalmente después de la etapa (iv) o se reduce en un factor de, por ejemplo, 10-200, por ejemplo de 30-100 si se diluye en la etapa (v).

20 La proporción de los polipéptidos o porciones de polipéptidos derivables del líquido de eclosión de peces en las composiciones cosméticas puede definirse con relación a los otros solutos en la composición, es decir, excluyendo los disolventes, por ejemplo, el agua. Por lo tanto, dichos polipéptidos o porciones de polipéptidos, en combinación, pueden estar presentes en el intervalo del 1-100 % en p/p de la masa seca de la composición. En algunas realizaciones, los polipéptidos o porciones de polipéptidos, en combinación, pueden estar presentes en el intervalo del 1-90 % en p/p de la masa seca de la composición, por ejemplo, del 5-80 %, 10-70 %, 20-60 %, 30-50 % en p/p de la masa seca de la composición. En otras realizaciones, los polipéptidos o porciones de polipéptidos, en combinación, pueden estar presentes en el intervalo del 1-40 %, 2-39 %, 3-38 %, 4-37 %, etc. en p/p de la masa seca de la composición. Así, polipéptidos individuales o porciones de polipéptidos pueden estar presentes en el intervalo del 0,0001 al 50 % en p/p de la masa seca de la composición, por ejemplo, del 0,0001 al 40 %, del 0,001 al 30 %, del 0,01 al 25 % en p/p de la masa seca de la composición. Como se describe en el presente documento, la composición se puede diluir para usarse de acuerdo con la invención en la etapa (v).

35 Aunque la invención está dirigida a métodos para mejorar la apariencia cosmética de la piel, esto puede incluir el tratamiento de un trastorno, anomalía o afección, pero en todos los casos el tratamiento es de naturaleza cosmética.

50 Como se denomina en este documento "cosmético", se refiere a un tratamiento que no cura, trata o previene una enfermedad o trastorno, sino que sirve 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 contenido de humedad de la piel.

55 La base de los tratamientos descritos en la presente memoria son los efectos antienvjecimiento de la piel de la composición cosmética como se describe en el presente documento. Estos efectos se han mostrado en los ejemplos proporcionados en este documento.

60 Por lo tanto, se contemplan tratamientos basados en las propiedades antienvjecimiento de la composición cosmética.

La invención proporciona así un método cosmético para mejorar la apariencia de la piel de un animal mamífero, en el que a dicho animal se le administra una composición cosmética como se ha descrito anteriormente.

65 En una realización particularmente preferida, la piel es piel envejecida.

"Piel envejecida" se refiere a la piel que muestra uno o más signos 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 con relación a la piel óptima normal, es decir, piel sana, hidratada, normalmente pigmentada y no envejecida. En este sentido, la piel envejecida no tiene por qué estar relacionada con la edad del sujeto y puede envejecer prematuramente, por ejemplo, por exposición crónica a la luz solar (foto-daño). Por lo tanto, los parámetros relativos para "piel óptima normal" se pueden determinar como mediciones promedio de los signos de envejecimiento anteriores de un número de 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 del sol. Como alternativa, los parámetros relativos para "piel óptima normal" pueden tomarse como las medidas de sujetos que son más jóvenes que el sujeto en cuestión. En otras palabras, la composición descrita en este documento puede usarse para restaurar la apariencia juvenil de la piel, en relación con la piel del sujeto a una edad más temprana. Nosotros describimos un método cosmético para el tratamiento de la dermatoheliosis en un animal mamífero en el que se administra a dicho animal una composición cosmética como la descrita anteriormente, preferentemente en la que dicha composición se administra tópicamente.

Como alternativa, la invención proporciona una composición cosmética como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de dermatoheliosis en un animal mamífero, preferentemente en el que dicha composición cosmética es para la administración a la piel de dicho animal. En una realización particular, la composición es para administración tópica.

En una realización particularmente preferida, mejorar la apariencia cosmética de la piel (por ejemplo, piel envejecida o fotodañada) implica una reducción o prevención en la apariencia cosmética o la 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 y arrugas finas.

La reducción o prevención en la apariencia estética o la prevalencia de los signos o síntomas de, por ejemplo, piel envejecida o dermatoheliosis, puede significar que haya una reducción en el número y/o la gravedad del signo o síntoma. Por ejemplo, se puede reducir el número de líneas finas y arrugas y/o se puede reducir o minimizar el tamaño, por ejemplo, la profundidad, las arrugas o líneas finas. Además, la reducción o prevención puede implicar detener o reducir la velocidad de aparición de nuevos signos o síntomas.

"Piel seca" como se menciona en este documento se refiere a una epidermis que carece de humedad o sebo, a menudo caracterizada por un patrón de líneas finas, escamas y una sensación de picazón y/o ardor. La piel seca puede aparecer como una condición de la piel en sí misma (por ejemplo, debido a la edad) o puede ser el síntoma de un trastorno de la piel o una condición como el daño solar.

A este respecto, la reducción de la piel seca, la escamación, las líneas finas o la pérdida de agua transepidérmica se puede lograr mediante los efectos hidratantes de la composición descrita anteriormente.

Por lo tanto, se puede ver que la invención proporciona un método cosmético para humectar la piel de un animal mamífero, en el que se administra a dicho animal una composición cosmética tal como se define en este documento.

Como alternativa, la presente invención proporciona una composición cosmética como se describe en el presente documento para su uso en la hidratación de la piel de un animal mamífero. (La composición puede usarse como alternativa para preparar un medicamento cosmético para ese fin).

"Hidratación" como se menciona en este documento cubre hidratantes que evitan la pérdida de agua de la piel (por ejemplo PATE) así como hidratantes (humectantes) que atraen y retienen el agua cuando se aplican a la piel y emolientes (que mejoran la descamación defectuosa).

Como se ha mencionado anteriormente, dichas propiedades humectantes son ventajosas para mejorar el aspecto cosmético de la piel. En una realización particularmente preferida, la piel es la piel de la cara, las orejas, el cuello, las manos o el cuero cabelludo.

Las "arrugas" son dobleces, crestas o pliegues en la piel. Las arrugas de la piel suelen aparecer como resultado de procesos de envejecimiento. A este respecto, la dermis comprende muchos de los elementos estructurales de la piel, que incluyen colágeno, que da a la piel su fuerza, glicosaminoglicanos que dan a la piel su turgencia y fibras de elastina que dan elasticidad o resiliencia a la piel.

A medida que la piel envejece, la capa dérmica se vuelve más delgada y la piel también produce menos colágeno. Además, las fibras de elastina que proporcionan elasticidad se desgastan. Estos cambios en el andamiaje de la piel hacen que la piel se arrugue y se doble. Las crestas epiteliales de la unión dérmica-epidérmica se aplanan, lo que hace que la piel sea más frágil y facilita la cizalladura de la piel. Este proceso también disminuye la cantidad de nutrientes disponibles para la epidermis al disminuir el área de la superficie en contacto con la dermis, lo que también interfiere con el proceso normal de reparación de la piel.

En la capa subcutánea, las células adiposas se reducen con la edad. Esto da lugar a arrugas y flacidez más notorias (laxitud), ya que las células grasas no pueden "rellenar" el daño de las otras capas.

5 La exposición a la radiación UVA y UVB, es decir, la luz solar, hace que el colágeno se descomponga a un ritmo mayor que con el envejecimiento cronológico. La luz del sol daña las fibras de colágeno y causa la acumulación anormal de elastina. Cuando esta elastina inducida por el sol se acumula, las metaloproteinasas de la matriz (MMP) se producen en grandes cantidades. Normalmente, las metaloproteinasas remodelan la piel lesionada por el sol al fabricar y reformar el colágeno. Sin embargo, este proceso no siempre funciona bien y algunas de las metaloproteinasas realmente descomponen el colágeno. Esto resulta en la formación de fibras de colágeno desorganizadas conocidas como cicatrices solares. La repetición de este proceso imperfecto de reconstrucción/regeneración hace que se desarrollen arrugas y laxitud de la piel. La condición de la piel a tratar o prevenir cosméticamente es una condición, trastorno o anomalía de la pigmentación.

15 Los trastornos o anomalías de pigmentación de la piel, es decir, la hiperpigmentación, pueden ocurrir como resultado de la edad o pueden ser el resultado de un envejecimiento prematuro debido, por ejemplo, al daño solar. La pigmentación alterada puede ser el resultado de un exceso local de melanocitos o un aumento en la actividad de los melanocitos, o ambos. Los trastornos de la pigmentación incluyen manchas hepáticas, del sol o de la edad (lentigo solar) y otras imperfecciones, como las pecas.

20 Como se menciona en este documento "mejorar" el aspecto cosmético de la piel se determina con relación a la piel óptima normal, es decir, la piel sana, hidratada, normalmente pigmentada y no envejecida. Por lo tanto, con respecto a la piel envejecida, se pueden medir uno o más de los signos o síntomas del envejecimiento como se describe en los Ejemplos y se comparan con los mismos signos de piel que es cronológica o fisiológicamente más joven, preferentemente cuando la mejora es la reducción de uno o más de los signos o síntomas del envejecimiento.

25 En un aspecto preferido, los usos cosméticos se logran por administración tópica a la piel.

30 Como se usa en este documento, "tratar" se refiere a la reducción, alivio o eliminación, preferentemente a niveles normales, de uno o más de los síntomas o efectos cosméticos de dicha afección o trastorno, por ejemplo, la presencia o extensión de piel seca, la extensión o el área de pigmentación, etc. en relación con los síntomas o efectos presentes en una parte diferente del cuerpo de dicho individuo en el que la piel no padece dicha afección o trastorno y no está sujeta a dicho tratamiento o en un individuo normal correspondiente no sujeto a dicho tratamiento.

35 "Prevenir" o "reducir" se refiere a la prevención, o la reducción o el alivio absolutos de la extensión o el momento (por ejemplo, el retraso) de la aparición de ese síntoma o efecto. Por ejemplo, las afecciones tipificadas por piel arrugada, anormalmente pigmentada, y seca se pueden prevenir mediante la aplicación regular de las composiciones cosméticas descritas en este documento antes de la aparición de dicha afección.

40 Los métodos cosméticos de tratamiento o prevención de acuerdo con la invención se pueden combinar ventajosamente con la administración de uno o más ingredientes activos que son eficaces para tratar o prevenir los trastornos o condiciones y/o lograr, por ejemplo, la hidratación. Por lo tanto, las composiciones cosméticas descritas en la presente adicionalmente pueden contener uno o más de dichos ingredientes activos.

45 De acuerdo con un aspecto adicional más de la invención, proporcionamos composiciones como se define en la presente y opcionalmente uno o más ingredientes activos adicionales como preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en terapia con animales mamíferos o seres humanos, como se describe en este documento.

50 Las composiciones descritas en este documento se pueden formular de una manera convencional con uno o más vehículos, excipientes y/o diluyentes fisiológicamente aceptables, de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica usando ingredientes fácilmente disponibles. Las composiciones se pueden proporcionar como emulsiones de aceite/agua a base de agua, a base de glicerina, a base de alcohol (hasta 20 %), a base de acrilato, emulsiones de aceite/agua a base de goma xantana o emulsiones de agua/aceite, por ejemplo, a pH 3,5-11, preferentemente a pH 5,5-9.

60 Por lo tanto, las composiciones se pueden incorporar, opcionalmente junto con otras sustancias activas como preparación combinada, con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes convencionales, para producir preparaciones galénicas convencionales tales como polvos, bolsitas, sellos, elixires, suspensiones (fluidos de infusión), emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos, polvos envasados estériles y similares. Las composiciones pueden estabilizarse mediante el uso de liofilización, subenfriamiento o Permazima. Dichas composiciones forman composiciones de la invención (es decir, se preparan de acuerdo con la etapa (v)).

65 Los excipientes, vehículos o diluyentes adecuados son lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato cálcico, carbonato cálcico, lactosa cálcica, almidón de maíz, aglutinantes, tragacanto, gelatina,

silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, agua, agua/etanol, agua/glicol, agua/polietileno, glicol, propilenglicol, metilcelulosa, metilhidroxibenzoatos, propil hidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio, aceite mineral o sustancias grasas tales como grasa dura o mezclas adecuadas de las mismas. También se pueden usar agentes para obtener formulaciones de liberación sostenida, tales como carboxipolimetileno, carboximetilcelulosa, acetato ftalato de celulosa o poli (acetato de vinilo).

Las composiciones adicionalmente pueden incluir agentes lubricantes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes que incrementan la viscosidad, agentes de granulación, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes activos osmóticos, agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, potenciadores de la adsorción (por ejemplo, agentes penetrantes en la superficie, por ejemplo, sales biliares, lecitinas, tensioactivos, ácidos grasos, quelantes), agentes oscurecedores, disolventes orgánicos, antioxidantes, agentes estabilizantes, emolientes, siliconas, alfa-hidroxiácido, demulcentes, agentes antiespumantes, agentes hidratantes, vitaminas, fragancias, espesantes iónicos o no iónicos, tensioactivos, cargas, espesantes iónicos o no iónicos, secuestrantes, polímeros, agentes propulsores, alcalinizantes o acidificantes, opacificantes, agentes colorantes y compuestos grasos y similares. Algunos de estos componentes se describen con más detalle a continuación.

Otros ingredientes activos o componentes en la composición cosmética se pueden seleccionar entre uno o más de compuestos minerales, vitaminas, enzimas, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, polisacáridos, sustancias adecuadas como filtros solares, exfoliantes químicos, extractos, agentes acondicionadores de la piel, antioxidantes y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de proteínas que pueden incluirse en la composición de la invención incluyen colágeno y/o un derivado del mismo (por ejemplo, porciones del mismo como se define anteriormente), una proteína o péptido que es capaz de promover el crecimiento celular, glicoproteína 1, glicoproteína 2 y laminina.

La composición de la invención se puede proporcionar con enzimas que incluyen, pero no se limitan a, una o más de las enzimas de la fruta (por ejemplo bromelaína), superóxido dismutasa, peroxidasa, hialuronidasa y mucopolisacaridasa.

Los péptidos se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, uno cualquiera o más de D,L-carnosina, D-carnosina, L-carnosina, anserina y Matrixil (derivado de pentapéptido).

Los aminoácidos se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, uno o más de L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-cisteína, L-cistina, glicina, L-glutamina, ácido L-glutámico, L-histidina, L-iso-leucina, 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 que incluyen aminoácidos no naturales como se define en la Tabla 1. Los aminoácidos particularmente preferidos como antioxidantes se pueden seleccionar entre uno cualquiera o más de glicina, lisina, arginina, cisteína, cistina, histidina, tirosina y triptófano.

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
Ácido aminoisobutírico	Aib	Ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
Aminonorbornil-carboxilato	Norb	L-N-metilcisteína	Nmcys
Ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilglutamina	Nmgln
Ciclopentilalanina	Cpen	Ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
D-alanina	Dal	L-N-metilhistidina	Nmhis
D-arginina	Darg	L-N-metilisoleucina	Nmile
Ácido D-aspártico	Dasp	L-N-metil-leucina	Nmleu
D-cisteína	Dcys	L-N-metil-lisina	Nmlys
D-glutamina	Dgln	L-N-metil-metionina	Nmmet
Ácido D-glutámico	Dglu	L-N-metilmorleucina	Nmnle
D-histidina	Dhis	L-N-metilnorvalina	Nmnva
D-iso-leucina	Dile	L-N-metilornitina	Nmorn
D-leucina	Dleu	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-lisina	Dlys	L-N-metilprolina	Nmpro
D-metionina	Dmet	L-N-metilserina	Nmser
D-ornitina	Dorn	L-N-metil-treonina	Nmthr
D-fenilalanina	Dphe	L-N-metil-triptófano	Nmtrp
D-prolina	Dpro	L-N-metil-tirosina	Nmtyr
D-serina	Dser	L-N-metil-valina	Nmval
		L-N-metiletilglicina	Nmetg
		L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug

ES 2 661 048 T3

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
D-treonina	Dthr	L-norleucina	Nle
D-triptófano	Dtrp	L-norvalina	Nva
D-tirosina	Dtyr	$\alpha$ -metil-aminoisobutirato	Maib
D-valina	Dval	$\alpha$ -metil- $\gamma$ -aminobutirato	Mgab
D- $\alpha$ -metilalanina	Dmala	$\alpha$ -metilciclohexilalanina	Mchexa
D- $\alpha$ -metilarginina	Dmarg	$\alpha$ -metilciclopentilalanina	Mcpen
D- $\alpha$ -metilasparagina	Dmasn	$\alpha$ -metil- $\alpha$ -naftilalanina	Manap
D- $\alpha$ -metilaspartate	Dmasp	$\alpha$ -metilpenicilamina	Mpen
D- $\alpha$ -metilcisteína	Dmcys	N-(4-aminobutil) glicina	Nglu
D- $\alpha$ -metilglutamina	Dmgln	N-(2-aminoetil) glicina	Naeg
D- $\alpha$ -metilhistidina	Dmhis	N-(3-aminopropil) glicina	Norn
D- $\alpha$ -metilisoleucina	Dmile	N-amino- $\alpha$ -metilbutirato	Nmaabu
D- $\alpha$ -metil-leucina	Dmleu	$\alpha$ -naftilalanina	Anap
D- $\alpha$ -metil-lisina	Dmlys	N-bencilglicina	Nphe
D- $\alpha$ -metilmetionina	Dmmet	N-(2-carbamiletíl) glicina	Nglu
D- $\alpha$ -metilornitina	Dmorn	N-(carbamilmetil) glicina	Nasn
D- $\alpha$ -metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carboxietil) glicina	Nglu
D- $\alpha$ -metilprolina	Dmpro	N-(carboximetil) glicina	Nasp
D- $\alpha$ -metilserina	Dmser	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D- $\alpha$ -metiltreonina	Dmthr	N-cicloheptilglicina	Nchep
D- $\alpha$ -metiltriptófano	Dmtrp	N-ciclohexilglicina	Nchex
D- $\alpha$ -metiltirosina	Dmtyr	N-ciclododecilglicina	Ncdec
D- $\alpha$ -metilvalina	Dmval	N-ciclododecilglicina	Ncdod
D-N-metilalanina	Dnmala	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D-N-metilarginina	Dnmarg	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D-N-metilaspargina	Dnmasn	N-cicoundecilglicina	Ncund
D-N-metilaspartate	Dnmasp	N-(2,2-difeniletíl) glicina	Nbhm
D-N-metilcisteína	Dnmcys	N-(3,3-difenilpropil) glicina	Nbhe
D-N-metilglutamina	Dnmgln	N-(3-guanidinopropil) glicina	Narg
D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(1-hidroxi-etil) glicina	Nthr
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxi-etil) glicina	Nser
D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(imidazoliletíl) glicina	Nhis
D-N-metil-leucina	Dnmleu	N-(3-indolil etil) glicina	Nhtrp
D-N-metil-lisina	Dnmlys	N-metil- $\gamma$ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmt
D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil) glicina	Nilo	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil) glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metiltriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletíl) glicina	Nval
D-N-metiltirosina	Dnmtyr	N-metila-naftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	Gabu	N-(p-hidroxifenil) glicina	Nhtyr
L-t-butilglicina	Tbug	N-(tiometil) glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- $\alpha$ -metilalanina	Mala
L- $\alpha$ -metilarginina	Marg	L- $\alpha$ -metilasparagina	Masn
L- $\alpha$ -metilaspartate	Masp	L- $\alpha$ -metil-t-butilglicina	Mtbug
L- $\alpha$ -metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
L- $\alpha$ -metilglutamina	Mgln	L- $\alpha$ -metilglutamato	Mglu
L- $\alpha$ -metilhistidina	Mhis	L- $\alpha$ -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- $\alpha$ -metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltioetil) glicina	Nmet
L- $\alpha$ -metil-leucina	Mleu	L- $\alpha$ -metil-lisina	Mlys
L- $\alpha$ -metilmetionina	Mmet	L- $\alpha$ -metilnorleucina	Mnle
L- $\alpha$ -metilnorvalina	Mnva	L- $\alpha$ -metilornitina	Morn
L- $\alpha$ -metilfenilalanina	Mphe	L- $\alpha$ -metilprolina	Mpro
L- $\alpha$ -metilserina	Mser	L- $\alpha$ -metiltreonina	Mthr
L- $\alpha$ -metiltriptófano	Mtrp	L- $\alpha$ -metiltirosina	Mtyr
L- $\alpha$ -metilvalina	Mval	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhphe
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

- La composición cosmética puede comprender uno o más lípidos que incluyen grasas, aceites, ceras y similares. Los aceites polares adecuados son, por ejemplo, aquellos del grupo de lecitinas y triglicéridos de ácidos grasos, en concreto, los ésteres de triglicerol de ácidos alcanocarboxílicos saturados y/o insaturados, ramificados y/o no ramificados con una longitud de cadena de 8 a 24, en particular de 12 a 18, átomos de carbono. Los triglicéridos de ácidos grasos, por ejemplo, se pueden seleccionar ventajosamente del grupo de aceites sintéticos, semisintéticos y naturales, tales como, por ejemplo, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de almendras, 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 nuez de macadamia y similares.
- Alternativa o adicionalmente, el aceite se puede seleccionar entre 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 exhibe una presión de vapor de no más de 0,2 mm de Hg 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.
- Los aceites no volátiles se pueden seleccionar entre aceites de silicona no volátiles, aceites de hidrocarburos 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.
- Los aceites hidrocarbonados no volátiles adecuados incluyen ésteres ramificados de diglicerina o triglicerina o los ésteres o 1,2,3,4-butano-triol o eritritol, di-eritritol o tri-ortiritol. Preferentemente, los aceites hidrocarbonados no volátiles comprenden trietilhexanoato de eritritilo (disponible como Salacos E-38 de Nisshin Oilio) y poligliceril-2 triisosteato (disponible como Cosmol 43V de Nisshin Oilio), carbonato de dietilhexilo (disponible como Tegosoft DEC de Degussa), dicapriléter (disponible como Cetiol OE de Cognis AG), carbonato de dicaprilol (disponible como Cetiol CC de Cognis AG), isononanoato de isononilo (disponible como Lanol 99 de Seppic), neopentanoato de tridecilo (suministrado como Ceraphil 55 de International Specialty Products), o una mezcla de los mismos.
- Los aceites volátiles se pueden seleccionar entre aceites de silicona volátiles, aceites de hidrocarburos volátiles tanto funcionalizados como no funcionalizados y mezclas de los mismos. El aceite volátil útil en la presente invención puede ser saturado o insaturado, tener una estructura de cadena lineal o ramificada o cíclica o tener una o más de estas características.
- Los ejemplos de aceites de hidrocarburos volátiles incluyen polidecanos tales como isododecano e isodecano (por ejemplo, Permetil-99A que está disponible en Presperse Inc.) y las isoparafinas C7-C15 (tales como la Serie Isopar disponible en Exxon Chemicals).
- El aceite de silicona volátil se puede seleccionar entre ciclopentasiloxano, ciclohexasiloxano o una mezcla de los mismos. Los ejemplos de aceites de silicona cíclicos volátiles disponibles en el mercado incluyen DC 244, DC 245, DC 344 y DC 345 de Dow Corning Corp.; Silicone Fluids SF-1204 y SF-1202 de Momentive Performance Materials; GE 7207 y 7158 de General Electric Co.); y, SWS-03314 de SWS Silicones Corp.
- El aceite de silicona volátil lineal puede ser un polimetilsiloxano lineal. Un ejemplo de polimetilsiloxanos lineales disponibles en el mercado incluye DC 200 Fluid, 5Cst de Dow Corning Corp.
- La composición cosmética de la invención además puede comprender uno o más polisacáridos seleccionados entre, pero no se limitan a, uno cualquiera o más de polisacáridos aniónicos (por ejemplo, ácido algínico, pectina, goma de xantano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, goma arábica, goma de karaya, goma de tragacanto, carboximetilquitina, goma de celulosa, glicosaminoglicanos), polisacáridos catiónicos (por ejemplo, quitosano, quitosano acetilado, goma de guar catiónica, hidroxietilcelulosa catiónica (HEC)), polisacáridos no iónicos (por ejemplo, almidón, dextrinas, goma de guar, éteres de celulosa tales como hidroxietilcelulosa, metilcelulosa y nitrocelulosa), polisacáridos anfóteros (por ejemplo, carboximetilquitosano, N-hidroxi-dicarboxietil-quitosano, almidón de patata modificado) y polisacáridos hidrófobos (por ejemplo, cetil hidroxietilcelulosa, poli-quaternium24).
- La composición cosmética además puede comprender una sustancia adecuada como un filtro de protección solar tal como un protector solar orgánico, por ejemplo, un derivado cinámico. El protector solar orgánico activo se puede seleccionar entre un protector solar orgánico hidrófilo, un protector solar orgánico hidrófobo o mezclas de los mismos. Los ejemplos adecuados de filtros solares se pueden encontrar en el CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7ª edición, volumen 2, pp. 1672, editado por Wenning y Mc Ewen (The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C., 1997).
- El protector solar orgánico se puede seleccionar entre derivados de alquil  $\beta,\beta$ -difenilacrilato, derivados de  $\alpha$ -ciano  $\beta,\beta$ -difenilacrilato, derivados de antranilato, derivados de benzofenona, derivados de alcanfor, derivados de dibenzoilmetano, derivados p-aminobenzoicos, derivados salicílicos, derivados de triazina o sus mezclas. Por ejemplo, el filtro solar orgánico hidrófobo se puede seleccionar entre 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 metoxidibenzoilmetano de butilo o Avobenzone, incluye Parsol TM 1789 de Givaudan Roure SA y Eusolex TM 9020 de Merck & Co., Inc. Un ejemplo del 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.

Ejemplos adecuados de protectores solares derivados cinámicos se pueden encontrar en el CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7ª edición, volumen 2, pp. 1672, editado por Wenning y Mc Ewen (The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C., 1997). El derivado cinámico se puede seleccionar entre 2-etilhexil-p-metoxicinamato, metoxicinamato de dietanolamina, 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 contener un exfoliante químico seleccionado entre, pero no limitado a, uno cualquiera de los alfa hidroxiaácidos (AHA), beta hidroxiaácidos (BHA) o polihidroxiaácidos, como ácido salicílico, ácido glicólico, ácido cítrico y ácido málico.

Los extractos que pueden incorporarse en la composición cosmética incluyen, pero no se limitan a extractos de plantas, que pueden comprender compuestos fenólicos tales como, por ejemplo, flavonoides (por ejemplo, glicosil rutina, ácido ferúlico, ácido cafeico), furfuralideno glucitol, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, ácido de resina nordihidroguayarática, ácido nordihidroguaiarético, trihidroxibutirofenona y derivados de los mismos. Los extractos de plantas particulares para su uso en la composición de la invención incluyen extracto de aloe vera, extracto de ginseng y extracto de cola de caballo.

El extracto de ginseng se puede obtener 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 cola de caballo se puede obtener extrayendo con un disolvente hidrófilo (por ejemplo, agua, etanol, glicol o cualquier mezcla de los mismos) la hierba entera de Equisetum arvense. El extracto contiene silicatos, flavonoides, saponósidos, ácido cafeico y ácido ferúlico.

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

Los ejemplos de antioxidantes que se pueden proporcionar en la composición de la invención incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos, vitaminas, minerales, carotenoides, péptidos, tioles, compuestos de sulfoximina, quelantes, ácidos grasos insaturados, compuestos fenólicos, extractos de plantas, estilbenos, ácido úrico, manosa, ácido clorogénico, imidazoles (por ejemplo, ácido urocánico), furfuralideno sorbitol, ubiquinona, ubiquinol, plastoquinona, fitoesteroides y sus derivados (por ejemplo, sales, ésteres, éteres, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, péptidos y/o derivados lipídicos), algunos de los cuales que se describen arriba.

Las vitaminas se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, una o más de las vitaminas A y sus derivados (por ejemplo, retinoides o retinol o sus derivados, como palmitato de retinilo o propionato de retinilo), biotina, ácido fólico, pantotenato de calcio, nicotinamida, piridoxina HCl, piridoxal HCl, riboflavina, tiamina HCl, timidina, vitamina B12, vitamina B3 (por ejemplo, niacinamida), vitamina B5 (por ejemplo, pantenol), vitamina C y sus derivados (por ejemplo, palmitato de ascorbilo, fosfato de ascorbil-Mg, acetato de ascorbilo), tocoferoles y derivados (por ejemplo, acetato de vitamina E).

Los minerales se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, una cualquiera o más sales de molibdenato (por ejemplo,  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7$ ), de aluminio (por ejemplo,  $\text{AlCl}_3$ ), de calcio (por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ), de cobalto (por ejemplo,  $\text{CoCl}_2$ ), de cromo (por ejemplo,  $\text{CrK}(\text{SO}_4)$ ), de cobre (por ejemplo,  $\text{CuSO}_4$ ), de hierro (por ejemplo,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ), de potasio (por ejemplo, KCl), de magnesio (por ejemplo,  $\text{MgCl}_2$ ), de manganeso (por ejemplo  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$ ), de fosfato (por ejemplo,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), de carbonato (por ejemplo,  $\text{NaHCO}_3$ ), de silicato (por ejemplo,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ), de sodio (por ejemplo, NaCl), de vanadato (por ejemplo,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ), de níquel (por ejemplo  $\text{NiCl}_2$ ), de estaño (por

ejemplo  $\text{SnCl}_2$ ), de zinc (por ejemplo,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ), de selenio (por ejemplo, selenometionina, ebselen,  $\text{H}_2\text{SeO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), de sulfato y de nitrato.

5 Los carotenoides se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, uno cualquiera o más de los carotenos, por ejemplo,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -licopeno, fitoeno, etc. y sus derivados.

10 Los tioles se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, uno o más de aurotioglucosa, propiltiouracilo, tioredoxina, ácido lipoico, glutatión, cisteína, cistina, cistamina y sus ésteres de glucosilo, N-acetilo, metilo, etilo, propilo, amilo, butilo y laurilo, los ésteres de palmitoilo, oleilo,  $\gamma$ -linoleilo, colesterilo y glicerilo y sus sales, tiodipropionato de dilaurilo, tiodipropionato de diestearilo, ácido tiodipropiónico y derivados de los mismos.

15 Los compuestos de sulfoximina se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, uno o más de homocisteína sulfoximina, butioninsulfonas, penta-, hexa-, heptationina sulfoximina, que pueden incluirse en la composición de manera que se proporcionan en dosis muy bajas (por ejemplo, de pmol a  $\mu\text{mol/kg}$ ).

20 Los quelantes se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, uno o más de apoferritina, desferral, lactoferrina, ácidos grasos  $\alpha$ -hidroxilicos, ácido palmítico, ácido fítico,  $\alpha$ -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 se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, uno o más de ácido  $\gamma$ -linolénico, ácido linoleico, ácido oleico y derivados de los mismos.

25 Los estilbenos y sus derivados incluyen, por ejemplo, óxido de estilbeno y óxido de trans-estilbeno.

30 Se pueden incorporar una variedad de ingredientes activos opcionales adicionales en las composiciones cosméticas de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de estos ingredientes adicionales incluyen activos adicionales para el cuidado de la piel tales como farnesol, bisabolol, fitantriol, urea, guanidina (por ejemplo, aminoguanidina); compuestos de hexaminidina, sales o derivados de los mismos; aminas de azúcar; agentes autobronceadores (por ejemplo, deshdroxiacetona); agentes estructurantes; agentes gelificantes hidrófilos; medicamentos anti-acné (resorcinol, ácido salicílico, y similares); agentes calmantes y cicatrizantes de la piel tales como alantoína y similares; y agentes adecuados para fines estéticos, tales como aceites esenciales, fragancias, sensibilizadores cutáneos, opacificantes, compuestos aromáticos (por ejemplo, aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto y eugenol). Las composiciones descritas en este documento pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada de los ingredientes activos después de la administración al cuerpo empleando técnicas bien conocidas en la materia.

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

45 Se prefiere el uso de soluciones, suspensiones, geles y emulsiones, por ejemplo, el ingrediente activo puede transportarse en agua, un gas, un líquido a base de agua, un aceite, un gel, una emulsión, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite, una dispersión o una mezcla de los mismos.

50 El emulsionante se puede seleccionar entre emulsionantes no iónicos, emulsionantes aniónicos, emulsionantes catiónicos, emulsionantes bipolares, emulsionantes anfóteros o mezclas de los mismos. Los emulsionantes son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, McCutcheon's, Detergents and Emulsifiers, North American Edition (1986), publicado por Allured Publishing Corporation.

55 Cuando el vehículo cosméticamente aceptable es una emulsión de agua en silicona, los emulsionantes se seleccionan preferentemente entre copolímeros de polioxialquileno, copolímeros de poliglicerilo o mezclas de los mismos. Los copolímeros de polioxialquileno, también conocidos como poliéteres de silicona, se describen con detalle en la patente de los EE.UU. n.º 4.268.499. Un ejemplo de copolímeros de polioxialquileno disponibles en el mercado incluye DC5225C o DC2-5185C (dimeticona PEG/PPG-18/18 disponible como mezcla con ciclopentasiloxano) de Dow Corning Corp.; y, KF6017 o KF6028 (dimeticona PEG-9) de Shin-Etsu Inc. Ejemplos de emulsionantes de poliglicerilo disponibles en el mercado incluyen KF6100 y KF6104 de Shin-Etsu Inc.

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

65 Las composiciones tópicas incluyen geles, cremas, ungüentos, aerosoles, 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 en la materia.

Los ungüentos, geles y cremas, por ejemplo, pueden 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, dispersantes, de suspensión, espesantes o colorantes. Los polvos se pueden formar 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 dispersantes, solubilizantes o de suspensión. Los aerosoles se administran convenientemente desde paquetes presurizados, con el uso de un propulsor adecuado.

En algunas realizaciones, las composiciones cosméticas descritas en este documento pueden administrarse tópicamente a la piel a través de un producto, dispositivo o material al que el polipéptido o composición se ha aplicado, impregnado o unido químicamente. Con este fin, los vendajes, emplastos (por ejemplo, parches adhesivos), gasas, cintas quirúrgicas, hisopos de algodón u otros materiales absorbentes, por ejemplo, una mecha, vellón o esponja, o matrices de soporte pueden estar recubiertos, impregnados o unidos químicamente con una composición como se describe en este documento. Por ejemplo, muchas composiciones pueden aplicarse a la piel usando parches dérmicos que están bien descritos en la técnica, por ejemplo, los documentos US 2008/0038300, US 2009/0043236, WO 2005/067499 y WO 2009/085302, que se incorporan en este documento como referencia. En algunas realizaciones, el material que comprende la composición como se describe en este documento puede estar en forma de dispositivo que, por ejemplo, se puede usar por el sujeto a tratar. Por ejemplo, la composición como se describe en este documento se puede aplicar, impregnar o unir químicamente sobre un material o matriz de soporte que forma todo o parte de un pañal, guante, calcetín, etc.

Las composiciones cosméticas se pueden incluir en un envase, paquete o dispensador junto con instrucciones para la 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 una composición como se describe en este documento. La invención también se extiende a dichos productos, materiales o dispositivos para sus usos como se describe en este documento. Preferentemente, dicho producto es un vendaje, un parche (por ejemplo, un parche adhesivo), una gasa, una cinta quirúrgica o un bastoncillo de algodón o dicho dispositivo es un pañal, guante o calcetín.

La concentración de los ingredientes activos en las composiciones descritas en este documento puede depender de la fuente de la composición (es decir, el material de partida para el método descrito anteriormente), el modo de administración, el curso del tratamiento, la edad y el peso del paciente, la indicación cosmética, el cuerpo o el área del cuerpo a tratar y se puede variar o ajustarse de acuerdo con la elección. Generalmente, sin embargo, la composición preparada según el método de la invención después de la etapa (iv) se diluye en la etapa (v) al 0,001, 0,005, 0,01 o 0,1 al 50 %, por ejemplo al 0,005-40 %, por ejemplo del 0,1 al 25 %, tal como del 0,1 o del 0,5 al 5, por ejemplo el 1-5 % (p/p o v/v) para proporcionar la preparación final para su administración, particularmente para su administración tópica, por ejemplo, una solución al 1 % o al 3 % de la composición después de la etapa (iv).

Cuando se añaden componentes adicionales a la composición preparada por el método descrito anteriormente, por ejemplo agentes hidratantes adicionales como se describe en este documento, el componente adicional puede estar presente en las cantidades del 0,0001, 0,0005, 0,001 o del 0,01 al 50 %, por ejemplo, del 0,0005-40 %, por ejemplo del 0,01 al 25 %, tal como del 0,1 o del 0,5 al 5, por ejemplo, del 1-5 % (p/p de la preparación final para administración, particularmente para administración tópica). Dosis únicas eficaces para la composición pueden estar en el intervalo de 0,0001 a 100 mg/cm<sup>2</sup>/día (proteína total en la composición), por ejemplo, de 0,1-100 mg/cm<sup>2</sup>/día, preferentemente de 0,0001-10 mg/cm<sup>2</sup>/día, por ejemplo de 0,1-10 mg/cm<sup>2</sup>/día, cuando se aplica tópicamente, dependiendo del animal mamífero que está siendo tratado, tomada como una dosis única.

Preferentemente, las soluciones líquidas, cremas o suspensiones se emplearán para la administración tópica.

Los animales a los que se pueden aplicar o administrar las composiciones están limitados a 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 manera especialmente preferible, las composiciones se aplican o administran a seres humanos.

Los siguientes Ejemplos se dan solo a modo de ilustración en los que las Figuras a las que se hace referencia son las siguientes:

La Fig. 1 muestra una fotografía de un sujeto tratado con la composición de líquido de eclosión de la invención antes del tratamiento (línea basal), después de 2 semanas y después de 12 semanas de tratamiento. La reducción en varios signos de piel envejecida es evidente después tanto de las 2 como de las 12 semanas. Los valores proporcionados indican los cambios promedio para 35 participantes.

La Fig. 2 muestra una fotografía en primer plano del sujeto de la Fig. 1 para enfatizar la reducción de líneas finas y arrugas vistas después de 2 y 12 semanas de tratamiento con la composición de líquido de eclosión de la invención.

La Fig. 3 muestra una fotografía en primer plano de un sujeto tratado con la composición de líquido de eclosión de la invención antes del tratamiento (línea basal) y después de 12 semanas de tratamiento. El área en un círculo muestra una clara reducción de las arrugas después de 12 semanas de tratamiento.

La Fig. 4 muestra un diagrama de barras que representa el porcentaje de sujetos que se consideró que habían mejorado en varios signos de envejecimiento en función de una clasificación táctil/visual clínica en ambos lados de la cara.

La Fig. 5 muestra micrografías electrónicas de barrido (ampliación  $\times 400$ ,  $\times 5000$  y  $\times 15.000$ ) de la epidermis humana reconstruida tratada con agua, ácido glicólico al 5 %, bromelaina 1 mU/ml o composición de líquido de eclosión al 1 % durante 12 horas.

La Fig. 6 muestra micrografías electrónicas de barrido (ampliación  $\times 400$ ,  $\times 5000$  y  $\times 15.000$ ) de epidermis humana reconstruida tratada con agua, ácido glicólico al 5 %, bromelaina 1 mU/ml o composición de líquido de eclosión al 1 % durante 48 horas.

La Fig. 7 muestra micrografías claras de secciones de epidermis humana reconstruida sin tratar o tratadas con ácido glicólico al 5 %, bromelaina 1 mU/ml o composición de líquido de eclosión al 1 % durante 12 o 24 horas. La flecha (A) muestra la proliferación y la diferenciación celular y la flecha (B) muestra el estrato granuloso más denso y una mayor concentración de gránulos lamelares.

La Fig. 8 muestra (A) un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie y (B) una transferencia de Western del gel en (A) teñido con un anticuerpo producido contra un componente principal de una composición cosmética derivada del líquido de eclosión de salmón. Carril 1, líquido de eclosión de salmón; carril 2, líquido de eclosión de medaka; y carril 3, líquido de eclosión del pez cebra.

#### Ejemplo 1: Preparación de la composición

La composición se preparó a partir del líquido de eclosión de salmón que no está incluido en las reivindicaciones. Para mejorar la concentración de proteína del líquido de eclosión, los huevos de salmón se transfirieron a volúmenes mínimos de agua antes de la eclosión. La eclosión altamente sincrónica se puede inducir por temperaturas elevadas (ambiente) o por desoxigenación (Oppen-Berntsen et al., 1990, Aquaculture, 86, pp. 417-430), que produce un pequeño volumen de preparación muy concentrada de polipéptidos crudos y porciones de polipéptidos. La eclosión debe completarse en 2 horas para más del 95 % de los embriones.

El líquido de eclosión se filtró usando un filtro convencional con un tamaño de poro de 7  $\mu\text{m}$ , para eliminar el material que probablemente obstruiría los filtros en las etapas de filtración posteriores. Este filtrado, el líquido de eclosión procesado, puede congelarse durante años sin una degradación significativa, antes de descongelarse y emplearse para la purificación adicional de proteínas. Este hecho simplifica enormemente la producción de un material de partida para purificar la composición de líquido de eclosión.

El líquido de eclosión procesado se sometió a filtración usando un filtro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y se recogió el filtrado. El filtrado se diafiltra luego con un tamaño de exclusión de filtro de 8 kDa para intercambiar el agua del líquido de eclosión por tampón. En este caso, el tampón contenía fosfato 0,5 mM y NaCl 1 mM, aunque otros tampones son igualmente adecuados. Por ejemplo, son adecuados los tampones salinos tamponados con fosfato o los tampones que contienen Tris milimolar (por ejemplo, 10 mM) a pH alrededor de la neutralidad o ligeramente alcalinos (pH 7,5-8,5), que contienen NaCl 5 mM. El retenido de la etapa de diafiltración se recogió y se diluyó mediante la adición del tampón de modo que la actividad enzimática del filtrado, como se ha definido anteriormente, fue igual a 3400 mU/litro.

Finalmente, el filtrado se sometió a filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  y se recogió el filtrado final. Este filtrado es una preparación enriquecida de los polipéptidos y porciones de polipéptidos, que se encuentran en el líquido de eclosión crudo.

#### Ejemplo 2: Efectos in vivo de la composición de líquido de eclosión sobre piel envejecida

La composición del líquido de eclosión se preparó como se describe en el Ejemplo 1. La composición se preparó como una loción para la piel al 1 % y 3 % [v/v] (volumen total de composición por unidad de volumen de loción), las dos lociones activas para la piel en la prueba, y se comparó con una loción para la piel de control que no comprendía el componente activo, es decir, la composición de líquido de eclosión. La loción para la piel era una emulsión de aceite en agua (O/W). La fase oleosa representa el 9 % de la composición total y estaba emulsionada con lecitina hidrogenada.

Se realizó un ensayo clínico doble ciego, controlado con placebo para evaluar la efectividad y la tolerancia de los 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 al inicio del estudio, la semana 2, la semana 6 y la semana 12. La eficacia se evaluó mediante evaluación visual, instrumentación, fotografías digitales VISIA CR y cuestionarios de autoevaluación de los sujetos.

Número de sujetos

5 Ciento una (101) mujeres completaron la participación en el estudio (N> 30 para los tres tratamientos, es decir, un placebo y dos composiciones que comprenden el componente del líquido de eclosión en diferentes concentraciones).

Población e identificación de los sujetos

10 Los sujetos eran mujeres sanas de entre 40 y 65 años y se les asignó un número de tres dígitos que, cuando se usa junto con el número de estudio clínico, identificaba de forma única a cada sujeto del estudio. Este número se mantuvo con el sujeto a lo largo del estudio para mantener el anonimato del experimento.

*Criterio de elegibilidad*

15 Criterios de inclusión

1. Mujeres, de 40 a 65 años, inclusive, que en general tenían buena salud según lo determinado por el cuestionario de salud y elegibilidad.
- 20 2. Disposición para cooperar y participar siguiendo los requisitos del estudio durante la duración del estudio y para informar inmediatamente de cualquier síntoma adverso.
3. Fotodaño de leve a moderado determinado clínicamente (líneas finas, arrugas, hiperpigmentación, laxitud y aspereza) en la cara correspondiente a la escala modificada de clasificación de Griffith con puntuaciones de 3-7.
4. Libre de cualquier estado de enfermedad o afecciones físicas de la piel del rostro (por ejemplo, dermatitis atópica, eccema, psoriasis, dermatitis seborreica) que pueda perjudicar las evaluaciones de los sitios de prueba
- 25 5. Disposición para evitar períodos prolongados de exposición al sol y todo uso de cabinas de bronceado durante la duración del estudio. Se debe tener especial cuidado de usar ropa protectora, incluidas gafas de sol, y evitar la exposición al sol de 10:00 a.m. a 4:00 p.m.
6. Disponibilidad para continuar con el uso de todas las marcas convencionales de cosméticos de color, limpiadores, tonificadores (si corresponde) y desmaquillantes durante el estudio. Las mujeres debían abstenerse de utilizar productos antienvjecimiento o productos para aclarar la piel que no fueran el material de prueba asignado.
- 30 7. Disposición para eliminar todo el maquillaje al menos 20 minutos antes de cada visita programada a la clínica. No se aplicaron otros productos tópicos en la cara o el área de los ojos hasta que se completó la visita de estudio. Si una mujer llega sin haberse quitado todo el maquillaje, se le solicita que elimine el maquillaje residual en la clínica y se espera al menos 20 minutos antes de los procedimientos.
8. Las mujeres que estaban tomando terapias de reemplazo hormonal u hormonas para el control de la natalidad debían estar en un régimen estable durante al menos un mes antes del inicio del estudio y tenían que estar dispuestas a continuar y no cambiar este medicamento durante la duración del estudio. Las mujeres que no
- 40 9. Disponibilidad para cooperar y participar siguiendo los requisitos del estudio y para informar inmediatamente de cualquier síntoma adverso.

45 Criterio de exclusión

1. Mujeres con antecedentes de intolerancia o alergia a cualquier producto de cuidado personal.
2. Mujeres que hayan usado productos para aclarar la piel recetados o de venta libre, menos de 30 días antes del ingreso al estudio.
- 50 3. Mujeres que tenían una condición y/o enfermedad de la piel que el investigador examinador consideró inapropiada para la participación.
4. Mujeres que amamantaban, estaban embarazadas o planeaban quedarse embarazadas durante el estudio.
5. Mujeres que habían usado rutinariamente antioxidantes tópicos antienvjecimiento y antiarrugas, menos de 30 días antes del ingreso al estudio.
- 55 6. Mujeres que habían usado un tratamiento enzimático facial de la piel en los 6 meses previos del inicio del estudio.
7. Uso de Retin-A®, Retin-A Micro®, Renova®, Avita®, Tazorac®, Avage® o Differin® u otros retinoides tópicos en los 3 meses previos al inicio del estudio, o haber tomado Accutane o un retinoide oral en los últimos 6 meses.
8. Uso rutinario de productos que contienen alfa-, beta- o poli-hidroxiácido (incluido ácido salicílico y Lachidrin), retinol o derivados de retinol u otros productos "antienvjecimiento" en la cara dentro de los 30 días del inicio del estudio.
- 60 9. Mujeres que recibieron dermoabrasión facial o tratamiento exfoliante químico dentro en los 3 meses previos al tratamiento o durante el estudio.
10. Mujeres que recibieron tratamiento con RF ligera u otros dispositivos en el área tratada dentro del área tratada en los 6 meses previos al tratamiento o durante el estudio.
- 65

11. Mujeres que recibieron Botox, colágeno, inyecciones de grasa u otros métodos de aumento con material inyectado o implantado en el área tratada en los 9 meses previos al tratamiento o durante el estudio.

12. Mujeres que se han sometido a un procedimiento de rejuvenecimiento, estiramiento facial o cirugía de ojos o párpados en los 12 meses previos al inicio de esta prueba.

5 13. Mujeres que tenían condiciones dermatológicas preexistentes y/o latentes en la cara (por ejemplo, vitiligo, dermatitis atópica, psoriasis, rosácea, eccema, dermatitis seborreica, excoriaciones severas, etc.) o afección/enfermedad médica que, en opinión del investigador, podría haber interferido con el resultado del estudio.

10 14. Mujeres que tenían un historial de trastornos inmunodepresores/inmunodeficiencia (incluidos (infección por VIH o sida) o que actualmente usan medicamentos inmunosupresores.

15. Mujeres que participaron en cualquier otro estudio de uso clínico (los estudios de parches son aceptables).

16. Mujeres que tenían una enfermedad no controlada como diabetes, hipertensión, hipertiroidismo o hipotiroidismo. Algunas mujeres que tenían múltiples condiciones de salud fueron excluidas de la participación, incluso si las condiciones se pueden controlar mediante dieta, medicamentos, etc.

15 17. Mujeres que habían participado en cualquier ensayo clínico en los 28 días previos a la inclusión en el estudio.

Las mujeres fueron admitidas en el estudio a discreción del investigador o su designado en base al historial médico y las conclusiones de la entrevista y el examen previo al estudio.

20 *Diseño del estudio*

25 Se llevó a cabo un ensayo clínico doble ciego, controlado con placebo para evaluar la efectividad de los tratamientos tópicos para la piel en mujeres con lesiones cutáneas de leves a moderadas, es decir, piel facial envejecida. La duración de este ensayo fue de 12 semanas con visitas programadas al inicio del estudio, la semana 2, la semana 6 y la semana 12. La eficacia se evaluó mediante evaluación visual, instrumentación, fotografías digitales VISIA CR y cuestionarios de autoevaluación de los sujetos.

30 Tres grupos de N> 30 por grupo completaron el estudio. Los sujetos recibieron un tratamiento activo para la piel, concretamente la composición de líquido de eclosión descrita anteriormente, o un control de vehículo (agua) para aplicar a la cara durante doce semanas. La aleatorización de los sujetos en los 3 grupos se realizó de acuerdo con una aleatorización predeterminada.

Visita	Visita 1	Visita 2	Visita 2	Visita 2
	Base	Semana 2	Semana 6	Semana 12
Consentimiento informado, documentación de elegibilidad, evaluación facial	X			
Puntuación clínica del lado derecho e izquierdo para líneas, arrugas, hiperpigmentación moteada, laxitud, claridad y aspereza	X	X	X	X
Puntuación clínica del lado derecho e izquierdo para irritación objetiva y subjetiva (eritema, sequedad, ardor/picazón*, picazón*, sensación tensa/seca*)* informado por el panelista.	X	X	X	X
Imágenes VISIA-CR del lado derecho e izquierdo	X	X	X	X
Medidas del cutómetro en el lado derecho e izquierdo de la cara.	X	X	X	X
Medidas de pérdida de agua transepidérmica (PATE) en el lado derecho e izquierdo de la cara.	X	X	X	X
Distribución del material de prueba, vehículo, instrucciones de uso, diario y calendario.	X		X	
Realización de cuestionarios de autoevaluación para el lado derecho e izquierdo de la cara.		X	X	X
Revisión del diario y pesaje del producto para el cumplimiento		X	X	X

35 *Evaluaciones de eficacia y tolerabilidad*

Un evaluador clínico experto evaluó el lado derecho e izquierdo de la cara para los parámetros que se muestran a continuación. Se utilizó una escala de Griffith modificada, donde 0 = nada, 1-3 = leve, 4-6 = moderado y 7-9 = grave. Se usaron medios puntos cuando fue necesario para describir mejor la condición de la piel.

- 40
- Líneas finas
  - Arrugas
  - Hiperpigmentación
- 45

- Laxitud
- Opaco/mate (Claridad)

- 5 • Aspereza táctil

Un evaluador clínico experto evaluó el lado derecho e izquierdo de la cara para los parámetros que se muestran a continuación. Se usó una escala de cuatro puntos, donde 0 = nada, 2 = leve, 3 = moderado y 4 = grave. Se usaron medios puntos cuando fue necesario para describir mejor la condición de la piel.

10

- Eritema
- Sequedad/escala

- 15 • Sensación de ardor/picadura

- Comezón
- Sensación de apretado/seco

20

#### *Fotografía digital VISIA CR*

Las imágenes VISIA-CR se tomaron de los lados derecho e izquierdo de la cara. Los sujetos fueron fotografiados de tal manera que se retiró el cabello, se quitaron las joyas, los ojos estaban cerrados, el sujeto estaba centrado en el encuadre y tenía una expresión facial neutral.

25

#### *Pérdida de agua transepidermica (PATE)*

Antes de las mediciones instrumentales, se hizo que los sujetos se equilibraran a las condiciones ambientales de la clínica durante al menos 20 minutos. Las condiciones ambientales se registraron por hora durante las visitas de estudio. Durante este tiempo, los sujetos fueron calificados, respondieron cuestionarios y/o se les tomó una imagen VISIA CR.

30

El Tewameter se usó para medir la pérdida de agua transepidermica (PATE) en todas las visitas. Las mediciones se tomaron en la mejilla derecha e izquierda en la intersección de las líneas que se extienden hacia abajo desde la borde del ojo y horizontalmente a través de la parte inferior de la nariz.

35

El Tewameter mide la PATE utilizando un sistema de cámara abierta. Una sonda manual colocada sobre la superficie de la piel muestreó la humedad relativa en dos puntos sobre la superficie, lo que permite calcular la tasa de pérdida de agua a partir del gradiente de humedad medido.

40

#### *Cutometer MPA 580*

A todos los sujetos se les tomaron medidas de Cutometer 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 en un área pequeña de la piel y mide la respuesta elástica de la piel (movimiento de la piel dentro y fuera de la abertura) mediante una técnica óptica.

45

Para este estudio, se utilizó la sonda de 2 mm, se aplicó un vacío de 300 mbar y se realizaron dos ciclos de succión y liberación. Los tiempos de ciclo fueron 5 activos y 10 segundos inactivos.

50

Las mediciones se tomaron en la mejilla derecha e izquierda en la intersección de las líneas que se extienden hacia abajo desde el borde del ojo y horizontalmente a través de la parte inferior de la nariz, o una ubicación alternativa cerca de la mandíbula.

55

#### *Cuestionarios de evaluación y autoevaluación cutánea*

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

60

## Resultados

### Líneas finas

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

### Arrugas

15 En la semana 2, los sujetos tratados con una loción para la piel que comprendía una de las composiciones activas mostraron una reducción en las arrugas (por ejemplo, cambio porcentual del 2,15 % (solución al 1 %) y 1,75 % (solución al 3 %) en comparación con el placebo (0,70 %). La reducción de arrugas continuó en la semana 6 (por ejemplo, 6,13 % (solución al 1 %), 7,32 % (solución al 3 %) y 3,70 % (placebo) y la semana 12 (por ejemplo, 14,72 % (solución al 1 %), 15,15 % (solución al 3 %) y 9,57 % (placebo)). La Fig. 1 muestra un sujeto con una reducción del  
20 12,5 % en las arrugas. La Fig. 3 muestra un sujeto con una reducción del 26,32 % en las arrugas.

### Hiperpigmentación

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

### Laxitud

30 En la semana 2, los sujetos tratados con una loción para la piel que comprende una de las composiciones activas mostraron una reducción de laxitud (por ejemplo, cambio porcentual del 2,64 % (solución al 1 %) y 1,62 % (solución al 3 %) en comparación con el placebo (0,87 %). La reducción de laxitud continuó en la semana 6 (por ejemplo, 6,33 % (solución al 1 %) y 6,61 % (solución al 3 %), 2,51 % (placebo) y la semana 12 (por ejemplo, 10,55 % (solución al 1 %) y 11,33 % (solución al 3 %), 5,18 % (placebo)). La Fig. 1 muestra un sujeto con una reducción del  
35 7,69 % en la laxitud (flacidez) después de 12 semanas.

### Opaco/mate (Claridad)

40 En la semana 2, los sujetos tratados con una loción para la piel que comprende una de las composiciones activas mostraron una mejora en la claridad de la piel (por ejemplo, cambio porcentual del 12,95 % (solución al 1 %) y 16,00 % (solución al 3 %) en comparación con el placebo (10,67 %). La mejoría continuó en la semana 6 (por ejemplo, 29,26 % (solución al 1 %), 28,50 % (solución al 3 %) y 19,07 % (placebo) y la semana 12 (por ejemplo, 37,17 % (solución al 1 %), 39,18 % (solución al 3 %) y 26,72 % (placebo)). La Fig. 1 muestra un sujeto con una  
45 reducción del 33,33 % en la opacidad.

### Aspereza táctil

50 En la semana 2, los sujetos tratados con una loción para la piel que comprende una de las composiciones activas mostraron una reducción en la aspereza táctil de la piel (por ejemplo, cambio porcentual del 16,51 % (solución al 1 %) y el 20,24 % (solución al 3 %) en comparación con placebo (13,38 %). La mejoría continuó en la semana 6 (por ejemplo, 24,77 % (solución al 1 %), 26,65 % (solución al 3 %) y 16,79 % (placebo), pero no hubo una reducción adicional en la semana 12 (por ejemplo, 26,61 % (solución al 1 %), 29,19 % (solución al 3 %) y 15,79 % (placebo)).  
55 La Fig. 1 muestra un sujeto con una reducción del 12,5 % en la aspereza táctil.

### Sequedad/escamas

60 En la semana 2, los sujetos tratados con una loción para la piel que comprende una de las composiciones activas mostraron una reducción en la sequedad/descamación de la piel (por ejemplo, cambio porcentual del 72,09 % (solución al 1 %) y del 100,00 % (solución al 3 %) en comparación con el placebo (64,71 %). Sin embargo, en la semana 6 (por ejemplo, 86,05 % (solución al 1 %), 84,62 % (solución al 3 %) y 100,00 % (placebo)), y la semana 12 no hubo una reducción adicional en comparación con el placebo (por ejemplo, 90,70 % (solución al 1 %), 100,00 % (solución al 3 %) y 89,47 % (placebo)).  
65

PATE

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

10 Extensibilidad

Aunque los sujetos tratados con una loción para la piel que comprende una de las composiciones activas mostraron una mejora en la extensibilidad de la piel en la semana 2, esto fue solo ligeramente diferente al placebo (por ejemplo, cambio porcentual del 16,18 % (solución al 1 %) y del 17,21 % (Solución al 3 %) en comparación con el placebo (10,82 %). En la semana 6 no hubo una diferencia clara entre los tres tratamientos (por ejemplo, 18,04 % (solución al 1 %), 17,18 % (solución al 3 %) y 19,90 % (placebo), pero en la semana 12 hubo una mejora adicional para el tratamiento de la piel con las composiciones que comprenden el componente activo, que fue mayor que la del placebo (por ejemplo, 31,84 % (solución al 1 %), 33,57 % (solución al 3 %) y 16,48 % (placebo)).

Una comparación de la clasificación clínica táctil/visual en ambos lados de la cara realizada al inicio del estudio (línea basal) y después de 12 semanas de tratamiento muestra que todos los sujetos mostraron mejoras en la opacidad y aspereza de la piel después del tratamiento con la composición de líquido de eclosión de la invención y la mayoría de sujetos mostraron mejoras en las líneas finas (97 % de sujetos), arrugas (91 % de sujetos), hiperpigmentación (87 % de sujetos) y flacidez (80 % de sujetos) (Fig. 4).

Los cuestionarios revelan que a partir de las 6 semanas de uso se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las puntuaciones medias de las declaraciones sobre el aspecto general, sensación general, suavidad, lisura, claridad y elasticidad entre el placebo y la composición cosmética que comprende la composición de líquido de eclosión de la invención.

Por lo tanto, es evidente a partir de los resultados anteriores que la composición de extracto de líquido de eclosión demostró un efecto en cada aspecto de la piel envejecida en comparación con el placebo.

35 Ejemplo 3: Estudio comparativo in vitro de los efectos de la composición del líquido de eclosión sobre la epidermis humana reconstruida en relación con los tratamientos cosméticos de la piel conocidos

La epidermis humana reconstruida in vitro consiste en queratinocitos humanos normales cultivados en un filtro de policarbonato inerte en la interfaz aire-líquido, en un medio químicamente definido. Este modelo in vitro es histológicamente similar al de la epidermis humana in vivo.

La epidermis humana reconstruida (SkinEthic) se expuso en el lado del estrato córneo durante 12 horas, 24 horas o 48 horas a 200 µl de una de las siguientes soluciones:

Composición del líquido de eclosión al 1 %;  
5 % de ácido glicólico (AHA);  
1 mU/ml de bromelaína (enzima de la fruta); o  
dH<sub>2</sub>O (control).

Después de la exposición, los cultivos se fijaron en paraformaldehído al 4 % (p/v) en PBS a 4 °C y se analizaron mediante microscopio electrónico de barrido o microscopio óptico.

La evaluación de las micrográficas electrónicas de barrido de la epidermis humana reconstituida tratada después de 12 horas (Fig. 5) muestra que el tratamiento con una solución al 5 % de ácido glicólico da como resultado estrato córneo dañado y corrosión de la piel. El tratamiento con bromelaína produce descamación por digestión de la envoltura de las células. Por el contrario, el tratamiento con la composición de líquido de eclosión de la invención da como resultado la descamación por desprendimiento de corneocitos intactos porque solo se han degradado los sitios de unión celular. Por lo tanto, la solución de líquido de eclosión proporciona una microexfoliación suave de la piel.

Después de la exposición durante 48 horas, se micrográficas electrónicas de barrido de la epidermis humana reconstituida (Fig. 6) muestran que el ácido glicólico da como resultado una piel muy dañada, en la que la envoltura celular se ha roto y el citoesqueleto celular es claramente visible. Si bien el tratamiento con bromelaína resulta en una superficie de la piel bastante suave, todavía hay evidencia de parches ásperos. Sin embargo, el tratamiento con la composición de líquido de eclosión de la invención da como resultado una superficie de la piel ultra lisa que es mejor que la piel de control (es decir, no tratada). Por lo tanto, puede verse como que la composición de líquido de eclosión proporciona un efecto de suavizado de la piel.

La microscopía óptica de secciones de epidermis humana reconstruida (Fig. 7) muestra que la exposición al ácido glicólico durante 24 horas da como resultado la destrucción de las células vivas, incluidas las células madre epidérmicas del estrato basal. Todo lo que queda después del tratamiento con ácido glicólico son algunos núcleos picnóticos (donde la cromatina se ha condensado irreversiblemente) y células anucleadas. La exposición a bromelaína durante 24 horas produce alteraciones mínimas en el estrato basal y el estrato espinoso. Por el contrario, después de la exposición a la composición de líquido de eclosión de la invención durante 24 horas, la piel reconstruida muestra evidencia de proliferación y diferenciación celular (ver flecha A. 7) Después de 48 horas de exposición a la composición del líquido de eclosión, la piel muestra evidencia de un estrato granuloso más denso y una mayor concentración de gránulos lamelares (ver flecha B de la Fig. 7). Por lo tanto, la composición de líquido de eclosión de la invención tiene un efecto rejuvenecedor de la piel y da como resultado una mejora de la función de barrera de la piel.

#### Ejemplo 4: Análisis del líquido de eclosión de no salmónidos

Se analizó el líquido de eclosión de especies de peces no salmónidos para determinar si contiene polipéptidos que son equivalentes a los polipéptidos encontrados en composiciones cosméticas derivadas del líquido de eclosión de salmónidos.

Se generó un anticuerpo contra un componente polipeptídico principal de las composiciones de líquido de eclosión descritas en los Ejemplos 1-3. El anticuerpo se usó para determinar si están presentes polipéptidos similares en el líquido de eclosión de medaka (*Oryzias latipes*) y pez cebra (*Danio rerio*).

El líquido de eclosión de salmón se obtuvo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1.

El líquido de eclosión de medaka y pez cebra se obtuvo del Zebrafish Laboratorium en el Departamento de Biología de la Universidad de Bergen. A este respecto, se obtuvo una muestra de líquido de eclosión de pez cebra (30 ml) a partir de agua en la que se habían eclosionado aproximadamente 100 embriones. Se obtuvo una muestra de líquido de eclosión de medaka (14 ml) a partir de agua en la que se habían eclosionado aproximadamente 14 embriones. El agua de un acuario se usó como control en blanco.

Las muestras se concentraron por liofilización durante 48 horas (aproximadamente 10 veces) antes del análisis. La concentración de proteína de las muestras concentradas se midió en un espectrofotómetro a A280 nm. La absorbancia de las muestras fue: Salmón A280 = 5,6; medaka A280 = 1,6; y pez cebra A280 = 0,1.

Las muestras de polipéptidos concentrados se analizaron mediante SDS-PAGE. Los geles resultantes se tiñeron con azul de Coomassie o se analizaron mediante transferencia de Western, usando el anticuerpo mencionado anteriormente contra un componente principal de las composiciones de líquido de eclosión de salmón.

El gel teñido con Coomassie en la Fig. 8A muestra varias bandas claras para la muestra de medaka (carril 2), que son comparables a las bandas observadas en la muestra de salmón (carril 1). No se observaron bandas visibles en la muestra en blanco (no se muestra) o en la muestra de pez cebra (carril 3). Sin embargo, la ausencia de bandas visibles en la muestra de pez cebra puede explicarse por la concentración relativamente baja de proteína en la muestra de pez cebra. De forma similar, la presencia de bandas adicionales en la muestra de salmón puede explicarse por la alta concentración de proteína en la muestra de salmón, lo que significa que incluso proteínas menos abundantes son visibles.

La Fig. 8B muestra una transferencia de Western que demuestra que el anticuerpo reacciona específicamente con una sola banda en la muestra de salmón y reacciona de forma cruzada con una proteína tanto en la muestra de medaka como en la muestra de pez cebra. Nuevamente, la diferencia en la intensidad de las bandas se puede explicar por la diferente concentración de proteína en estas muestras.

El polipéptido identificado en la muestra de salmón tenía aproximadamente 25 kDa (carril 1). El polipéptido de reacción cruzada en la muestra de medaka tenía aproximadamente 35 kDa (carril 2) y aproximadamente 27 kDa en la muestra de pez cebra (carril 3). No se detectaron polipéptidos por el anticuerpo en la muestra en blanco (no mostrada). Si bien no se desea vincularse a ninguna teoría, la diferencia en el tamaño de los polipéptidos de salmón, medaka y pez cebra puede atribuirse a la variación entre especies y no es raro que polipéptidos funcionalmente equivalentes varíen en tamaño en diferentes especies, por ejemplo, debido a diferentes modificaciones postraduccionales, como la glucosilación.

Estos resultados indican que el líquido de eclosión de cada especie contiene una matriz similar de polipéptidos y las especies de peces que no son de salmónidos contienen polipéptidos que son estructuralmente similares a los polipéptidos en las composiciones cosméticas descritas en los Ejemplos 1-3. Se podría esperar que los polipéptidos en el líquido de eclosión de no salmónidos tengan las mismas propiedades funcionales que los polipéptidos en las composiciones cosméticas derivadas del líquido de eclosión de salmón. Por lo tanto, el líquido de eclosión de peces no salmónidos es un material de partida adecuado en los métodos descritos en la presente memoria y se espera que dé como resultado composiciones cosméticas eficaces de acuerdo con la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir o prevenir el aspecto cosmético o la prevalencia de arrugas, líneas finas, hiperpigmentación, laxitud, piel seca, descamación y/o pérdida de agua transepidérmica en la piel de un mamífero, que comprende administrar una composición cosmética a dicho animal, en la que dicha composición se obtiene o se puede obtener mediante un método que consta de las etapas de:
- suspender huevos de pescado, en el que dichos huevos no son huevos de salmónidos, en un volumen mínimo de agua;
  - inducir la eclosión rápida y sincronizada de dichos huevos, preferentemente de manera que la eclosión se complete en menos de 6 horas para más del 80 % de los embriones;
  - opcionalmente filtrar los huevos eclosionados para obtener el líquido de eclosión; y
  - filtrar el líquido de eclosión de b) o c) para obtener la composición, en la que la etapa de filtrar el líquido de eclosión consta al menos de las etapas de:
    - filtrar el líquido de eclosión usando un filtro con un tamaño de poro de al menos 5 µm, y recoger el filtrado;
    - 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;
    - intercambiar el agua en el filtrado de la etapa (ii) con un tampón farmacéutica o cosméticamente aceptable realizando diafiltración usando un filtro con un tamaño de exclusión de menos de 15 kDa;
    - repetir opcionalmente la etapa de diafiltración de la etapa (iii);
    - diluir opcionalmente la solución de la etapa (iii) o (iv) de modo que la solución tenga una actividad enzimática de 1000-10.000 ml/l, medida por la capacidad de la solución para escindir el sustrato cromogénico del Factor Xa (CH<sub>3</sub>OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH);
    - filtrar la solución de la etapa (iii), (iv) o (v) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 µm, y recoger el filtrado; y
    - preparar dicha composición cosmética a partir del filtrado de la etapa (vi).
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método sirve para reducir o prevenir el aspecto cosmético o la prevalencia de arrugas y/o laxitud.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que:
- 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.
  - 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 0,45 µm; y/o
  - el tamaño de poro del filtro en la etapa (vi) es de 0,22 µm.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los huevos son de un pez seleccionado de un pez de cualquier Superorden seleccionado de la lista que consiste en Osteoglossomorpha, Elopomorpha, Clupeomorpha, Ostariophysii, Protacanthopterygii (excluyendo peces de la familia Salmonidae), Stenopterygii, Cyclosquamata, Scopelomorpha, Lampridiomorpha, Polymyximorpha, Paracanthopterygii y Acanthopterygii.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el pez es de cualquier orden seleccionado de la lista que consiste en Osteoglossiformes, Hiodontiformes, Elopiformes, Albuliformes, Notacanthiformes, Anguilliformes, Saccopharyngiformes, Clupeiformes, Gonorynchiformes, Cypriniformes, Characiformes, Gymnotiformes, Siluriformes, Argentiniformes, Salmoniformes, (excluyendo peces de la familia Salmonidae), Esociformes, Osmeriformes, Ateleopodiformes, Stomiiformes, Aulopiformes, Myctophiformes, Lampriformes, Polymixiiformes, Percopsiformes, Batrachoidiformes, Lophiiformes, Gadiformes, Ophidiiformes, Mugiliformes, Atheriniformes, Beloniformes, Cetomimiformes, Cyprinodontiformes, Stephanoberyciformes, Beryciformes, Zeiformes, Gobiesociformes, Gasterosteiformes, Syngnathiformes, Synbranchiformes, Tetraodontiformes, Pleuronectiformes, Scorpaeniformes Perciformes y Acipenseriformes.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el pez es de cualquier familia seleccionada de la lista que consiste en Cyprinidae, Cichlidae, Pangasiidae, Sciaenidae, Serranidae, Carangidae, Sparidae, Lateolabracidae, Moronidae, Mugilidae, Latidae, Eleotridae y Acipenseridae.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el pez es una especie seleccionada de la lista que consiste en carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), Catla (*Catla catla*), carpa común (*Cyprinus carpio*), carpa cabezona (*Hypophthalmichthys nobilis*), carpa cruciana (*Carassius carassius*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus niloticus*), bagre panga (*Pangasius pangasius*), Roho labeo (*Labeo rohita*), corvina amarilla grande (*Larimichthys crocea*), mero graso (*Epinephelus tauvina*), medregal japonés (*Seriola quinqueradiata*), dorada (*Sparus aurata*), lubina japonesa (*Lateolabrax japonicus*), lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), dorada del Pacífico (*Chrysophrys auratus*), salmonete de cabeza plana (*Mugil cephalus*), Barramundi (*Lates*

calcarifer), gobio de mármol (*Oxyeleotris marmorata*), tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), esturión de Siberia (*Acipenser baerii*) y esturión del Danubio (*Acipenser gueldenstaedtii*).

- 5 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la piel de dicho animal está hidratada.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha composición cosmética es para su administración tópica a la piel.
- 10 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha preparación en la etapa (vii) comprende la adición de uno o más excipientes, diluyentes, componentes y/o ingredientes farmacéuticamente aceptables.
11. Un método para preparar una composición cosmética que consta de las etapas de:
- 15 a) suspender huevos de pescado, en el que dichos huevos no son huevos de salmónidos, en un volumen mínimo de agua;
- b) inducir la eclosión rápida y sincronizada de dichos huevos, preferentemente de manera que la eclosión se complete en menos de 6 horas para más del 80 % de los embriones;
- 20 c) filtrar los huevos eclosionados para obtener el líquido de eclosión; y
- d) filtrar el líquido de eclosión de c) para obtener la composición, en la que la etapa de filtrar el líquido de eclosión comprende al menos las etapas de:
- 25 (i) filtrar el líquido de eclosión 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 realizando diafiltración usando un filtro con un tamaño de exclusión de menos de 15 kDa;
- (iv) repetir opcionalmente la etapa de diafiltración de la etapa (iii);
- 30 (v) diluir opcionalmente la solución de la etapa (iii) o (iv) de modo que la solución tenga una actividad enzimática de 1000-10.000 mU/l, medida por la capacidad de la solución para escindir el sustrato cromogénico del Factor Xa (CH<sub>3</sub>OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH);
- (vi) filtrar la solución de la etapa (iii), (iv) o (v) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 µm, y recoger el filtrado; y
- 35 (vii) preparar dicha composición cosmética a partir del filtrado de la etapa (vi).
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 u 11, en el que la eclosión se completa en menos de 2 horas para más del 95 % de los embriones.
- 40 13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha composición cosmética está recubierta, impregnada o unida químicamente a un producto, material o dispositivo.
14. Una composición cosmética obtenible a partir del método definido en la reivindicación 11.
- 45 15. Un producto, material o dispositivo que está recubierto, impregnado o unido químicamente con una composición como se define en la reivindicación 14.

Figura 1

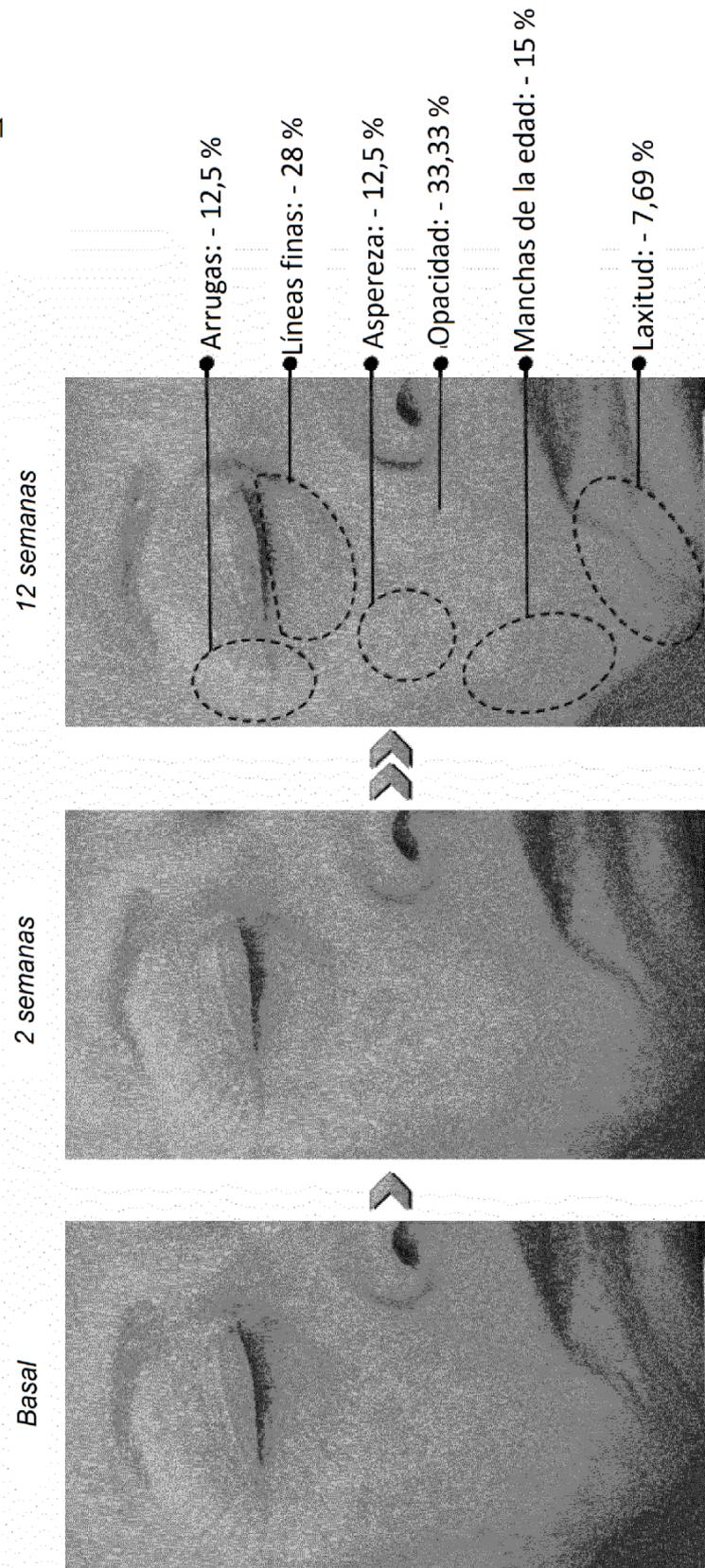


Figura 2

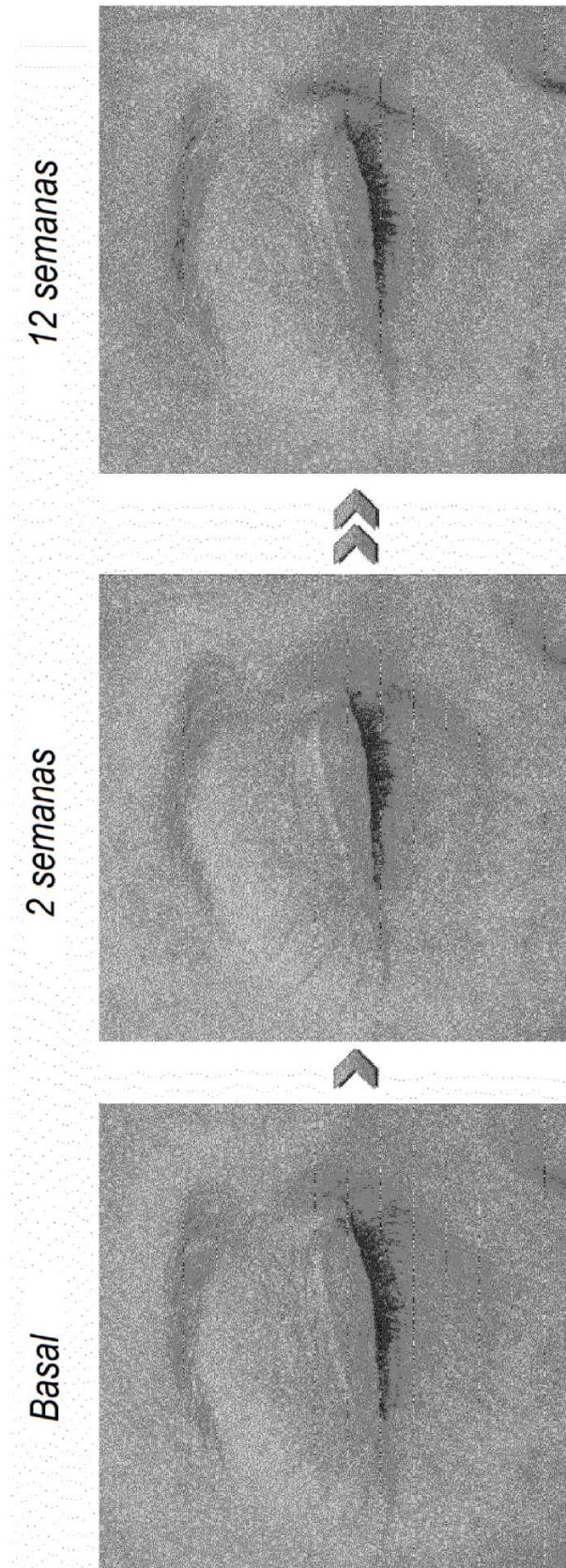


Figura 3

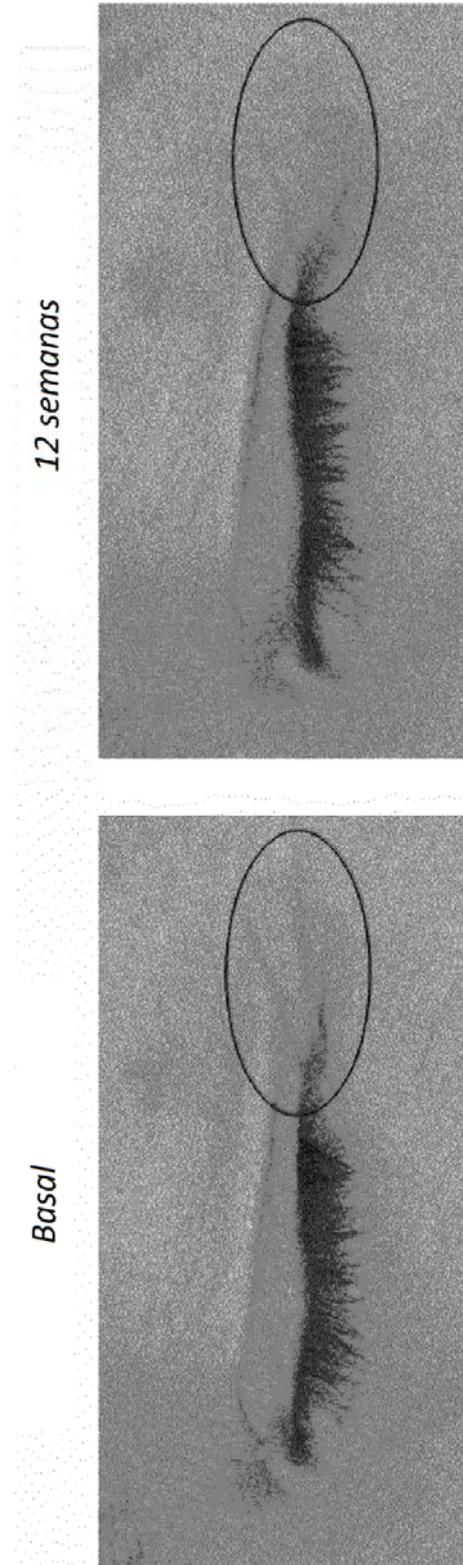


Figura 4

**Porcentaje de sujetos que mejoran después de 12 semanas**

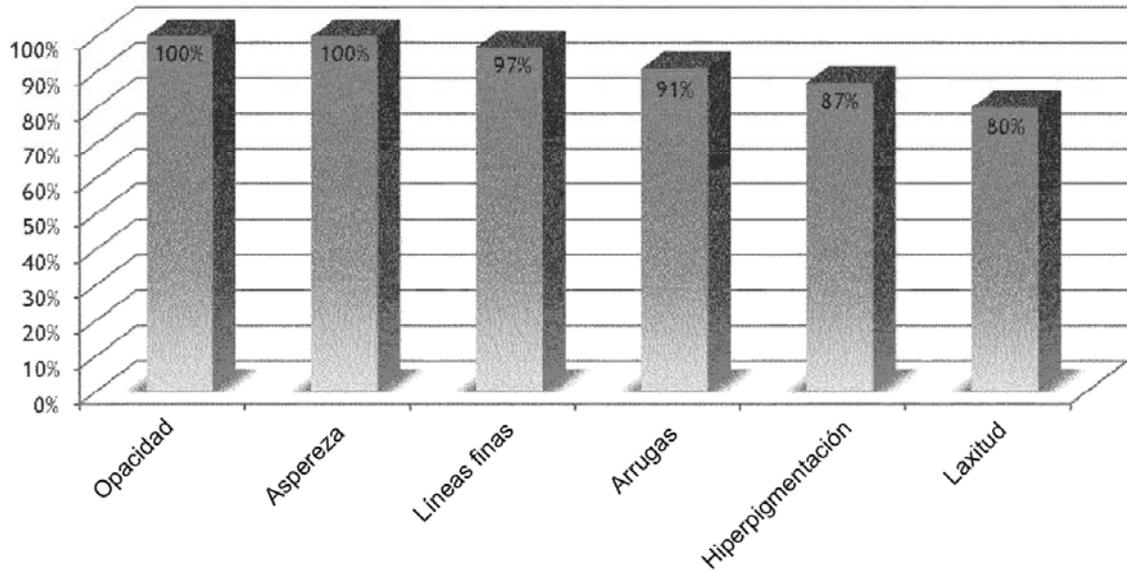


Figura 5

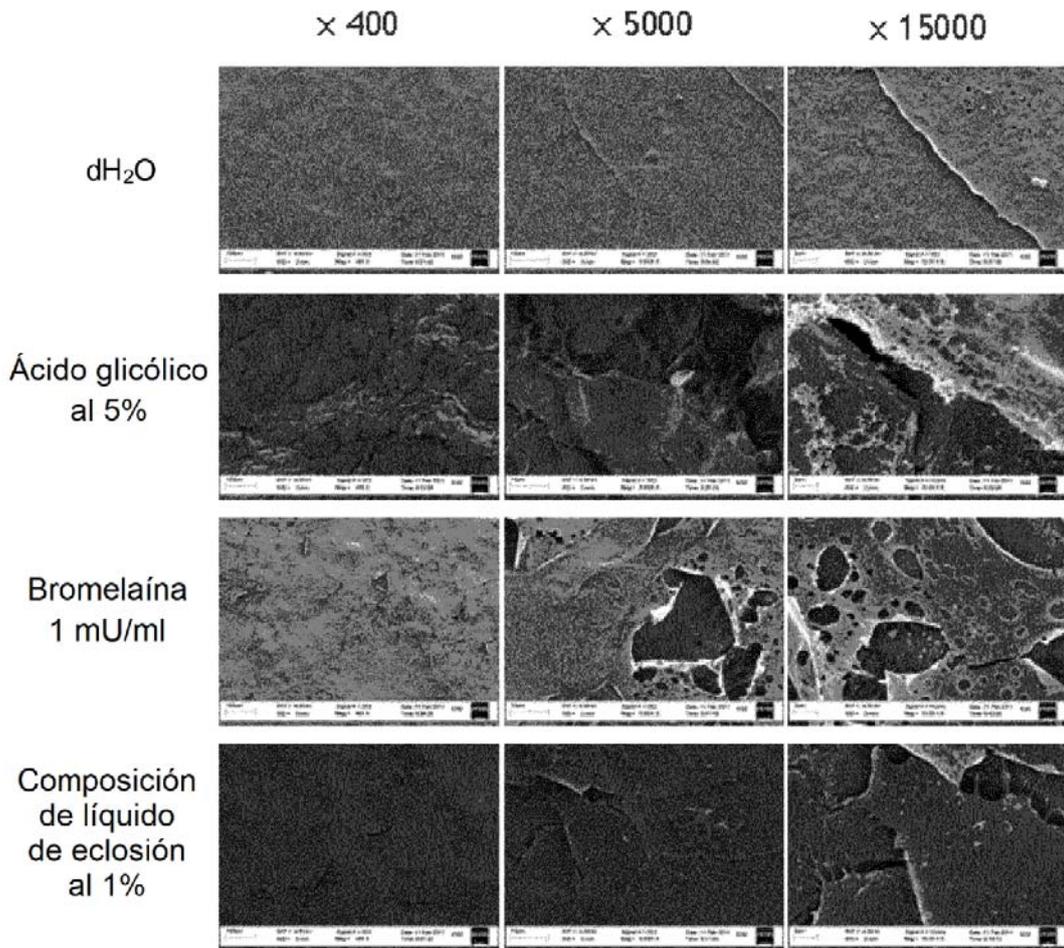


Figura 6

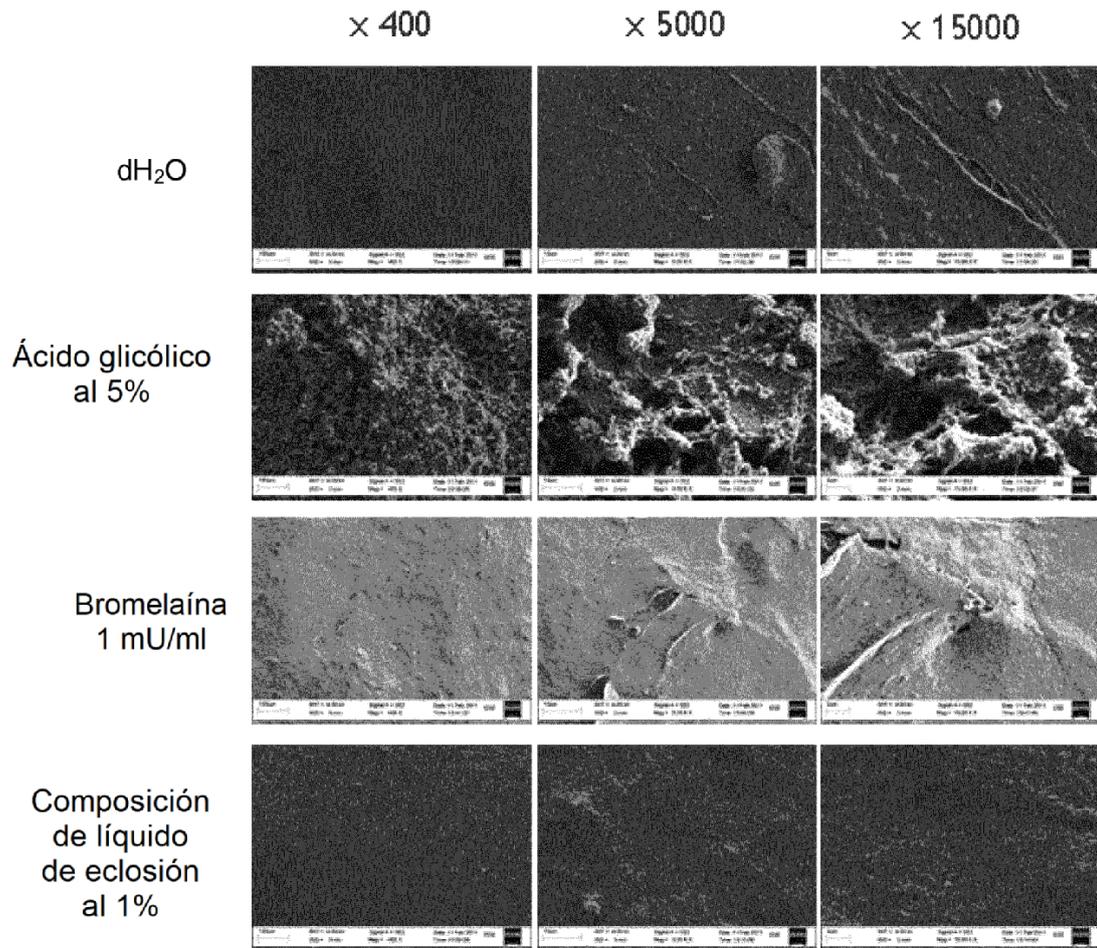


Figura 7

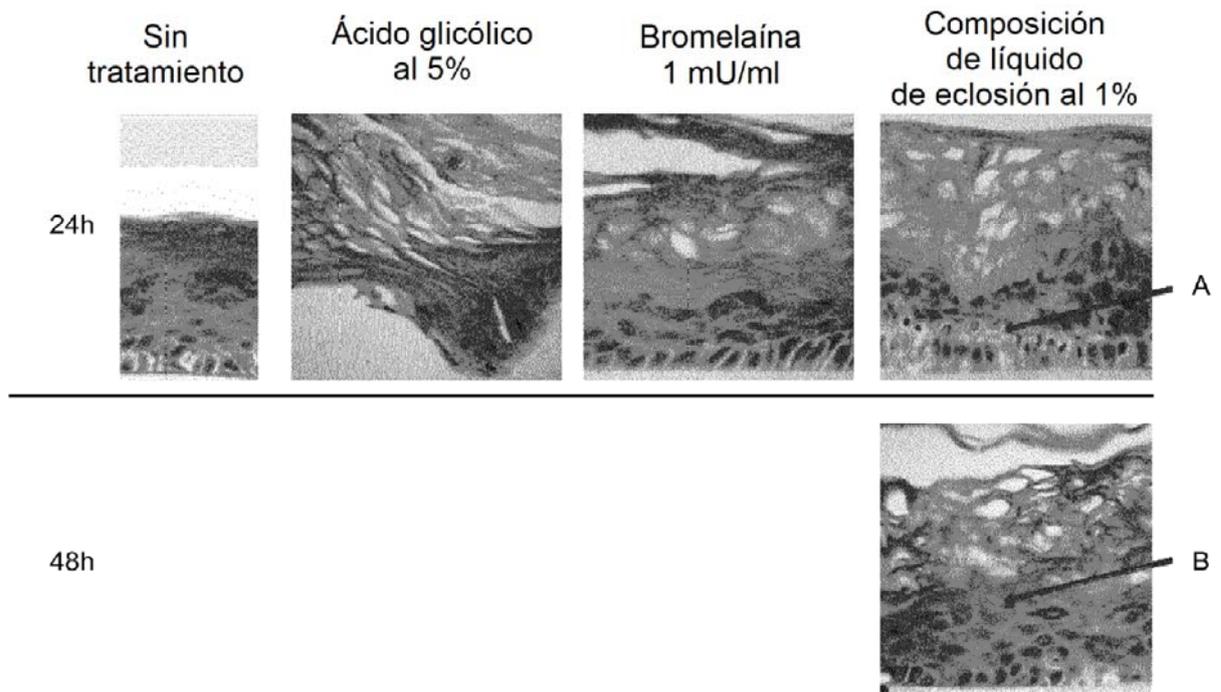
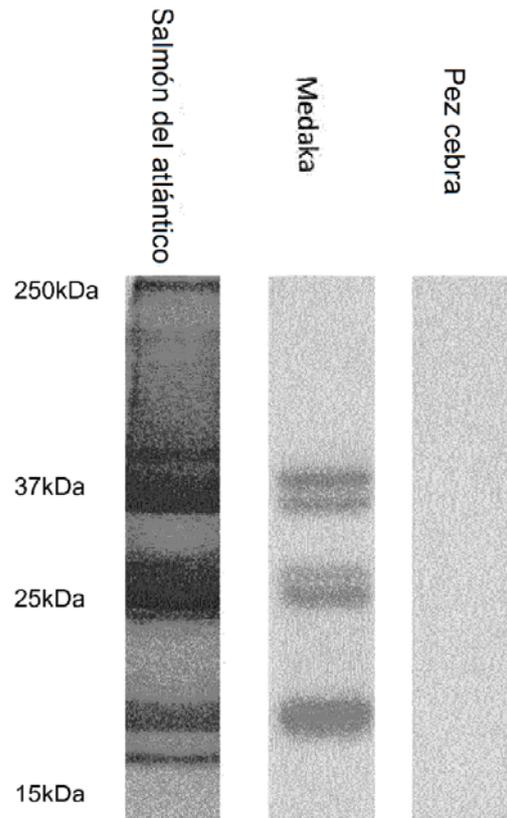


Figura 8

**A**



**B**

