

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 179**

51 Int. Cl.:

A61K 35/60	(2006.01)
A61P 17/10	(2006.01)
A61P 17/06	(2006.01)
A61P 17/12	(2006.01)
A61K 8/64	(2006.01)
A61K 8/98	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A61K 38/48	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01)
A61Q 19/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/EP2012/076853**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14094918**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12813868 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2934556**

54 Título: **Composiciones cosméticas y farmacéuticas a base de líquido de incubación de pescado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2019

73 Titular/es:
**AQUA BIO TECHNOLOGY ASA (100.0%)
Fornebuveien 42-44
1366 Fornebu, NO**

72 Inventor/es:
**LEREN, HANS KRISTIAN y
FAGOT, FANNY**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 721 179 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

Composiciones cosméticas y farmacéuticas a base de líquido de incubación de pescado

- 5 La presente invención se refiere a métodos para la producción de una composición que comprende polipéptidos y/o partes de polipéptidos, que pueden obtenerse de líquido de incubación de pescado, y su uso en diversas aplicaciones para la piel. En particular, las composiciones que comprenden dichos polipéptidos y/o partes de polipéptidos son útiles en el tratamiento de diversos trastornos o afecciones cutáneas médicos y cosméticos.
- 10 La piel es uno de los órganos más vulnerables del cuerpo. Aunque no son con frecuencia potencialmente mortales, los trastornos o afecciones cutáneas pueden ser incómodos y provocar discapacidades crónicas. Además, debido a que la piel es muy visible, los trastornos y afecciones cutáneas pueden conducir a tensión psicológica. Existe por lo tanto una necesidad continuada de tratamientos eficaces de las condiciones y trastornos cutáneos.
- 15 La piel forma el mayor órgano del cuerpo, representando aproximadamente el 12-16 por ciento del peso de una persona. Cumple muchos papeles vitales como barrera y como influencia reguladora entre el ambiente externo y el ambiente controlado dentro de nuestros cuerpos.
- 20 La piel consiste en 3 capas, a saber, la epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo. 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.
- 25 La epidermis consiste en epitelio escamoso estratificado, es decir, consiste en capas de células aplanadas. La piel, pelo y uñas están queratinizados, lo que significa que tienen una superficie hidrófoba endurecida, muerta, hechas de una proteína denominada queratina. La epidermis se hace impermeable debido a sus contenidos de lípidos extracelulares asociados con queratinocitos, especialmente en la capa media de la epidermis (estrato lúcido). Las membranas mucosas (por ejemplo del esófago, cavidad faríngea oral, órganos reproductores y otros) son principalmente no queratinizadas y húmedas. La epidermis tiene tres tipos principales de células, concretamente queratinocitos (células cutáneas), melanocitos (células productoras de pigmentos) y células de Langerhans (células inmunitarias). La célula de Merkel es una cuarta célula epidérmica, menos prevalente.
- 30 Los queratinocitos maduran y se diferencian con la acumulación de queratina a medida que se mueven hacia fuera. Con el tiempo caen o se desprenden por roce. Forman cuatro o cinco estratos definidos, que desde la más superficial a la más profunda son (i) el estrato córneo (capa córnea) con células duras, secas, muertas, sin núcleos, (ii) el estrato granuloso (capa granulosa) con células que contienen gránulos basófilos y se separan hacia fuera del estrato córneo por el estrato lúcido fino, (iii) el estrato espinoso (capa de células espinosas) en el que las células se aplanan cada vez más a medida que se mueven hacia arriba y (iv) el estrato basal (capa basal) con células regenerativas columnares (altas).
- 35 Inmediatamente debajo de la epidermis está la membrana basal, una estructura especializada que queda entre la epidermis y la dermis.
- 40 La dermis es el tejido conectivo fibroso o capa protectora de la piel. Las fibras principales son fibras de colágeno y elastina que están entrelazadas.
- 45 El tejido celular subcutáneo es la capa de grasa inmediatamente debajo de la dermis y epidermis. También se denomina tejido subcutáneo, hipodermis o panículo adiposo. El tejido celular subcutáneo consiste principalmente en células adiposas (adipocitos), nervios y vasos sanguíneos.
- 50 Se crean nuevas células cutáneas epiteliales en la capa inferior de la piel, el estrato granuloso. Con el tiempo, las células migran a la superficie de la piel y se hacen más ácidas. Durante su viaje de 30 días, mueren y se saturan con queratina. La queratina y los lípidos asociados son importantes debido a que protegen la piel de los elementos externos.
- 55 La enfermedad, lesión, factores ambientales, la edad, niveles hormonales, medicación, materiales aplicados por vía externa o ingeridos, condiciones genéticas o una diversidad de factores adicionales pueden conducir al funcionamiento anómalo de la piel que da como resultado irregularidades o anomalías. Algunas de estas irregularidades o anomalías pueden ser de naturaleza puramente cosmética, por ejemplo sequedad de la piel, arrugas o pigmentación alterada, o pueden ser más graves, lo que conduce a dolor o incomodidad, por ejemplo eccema y psoriasis.
- 60 La sequedad de la piel es una de las afecciones o anomalías cutáneas más habituales. Aunque determinados individuos son más susceptibles a la sequedad de la piel, la afección puede afectar a cualquier persona, independientemente de la edad, el sexo o el tipo de piel.
- 65 Se produce sequedad de la piel cuando se agota el agua de la capa externa de la piel (el estrato córneo con el estrato lúcido). Cuando esta capa está bien hidratada, minimiza la pérdida de agua a través de la piel y ayuda a mantener

fuera los 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 factores ambientales.

5 En condiciones normales, el estrato córneo tiene un contenido de agua de 10 % a 30 %. Esta agua proporciona a la piel su textura blanda, suave y flexible. El agua viene de la atmósfera, las capas subyacentes de la piel y el sudor. El aceite producido por las glándulas cutáneas y sustancias grasas producidas por células cutáneas actúan como hidratantes naturales, que permiten al sustrato córneo sellar agua en su interior.

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

15 Son muy deseables hidratantes que mejoren o erradiquen la sequedad de la piel. Aunque se conocen en la técnica muchos hidratantes, sigue existiendo la necesidad de productos naturales que sean eficaces pero suaves.

20 Otra anomalía o afección cutánea habitual es la cantidad excesiva de la capa córnea de la piel. Esto puede resultar de la incapacidad de la capa córnea para desprenderse o por deposición excesiva de queratina en la capa córnea. La primera puede producirse cuando el proceso natural de erosión cutánea se hace irregular, lo que da a la piel un carácter seco y rugoso. Los trastornos hiperproliferativos benignos incluyen hiperqueratosis epidermolítica (o piel agrietada) y queratosis de los folículos pilosos. Una afección hiperproliferativa benigna habitual es la hipertrofia periférica alrededor de cicatrices y/o formación de queloides. Otras afecciones hiperproliferativas son helomas, callos, verrugas hiperqueratóticas (particularmente verruga vulgar), ictiosis y queratosis palmoplantares.

25 Los tratamientos actuales implican exfoliación o cirugía en casos extremos. La hiperqueratosis se trata habitualmente ablandando la capa córnea y retirando la piel engrosada.

30 También puede usarse exfoliación para retirar células epidérmicas alteradas, por ejemplo células epidérmicas de una epidermis que muestra un trastorno de pigmentación, por ejemplo manchas cutáneas.

35 La exfoliación retira los estratos externos de la epidermis para revelar las células cutáneas más nuevas que se encuentran debajo. Puede realizarse exfoliación mediante medios físicos (es decir abrasión de la piel) o mediante medios químicos. Los exfoliantes químicos incluyen exfoliantes que contienen ácido salicílico, ácido glicólico, enzimas frutales, ácido cítrico o ácido málico y pueden ser aplicados en altas concentraciones por un dermatólogo, o en menores concentraciones en productos sin receta. 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 pegajosas que mantienen las células unidas en uniones celulares, permitiendo que se separen. Este tipo de exfoliación está recomendada para personas que se tratan de acné.

40 La mayor desventaja para la exfoliación es el alto precio de algunos de los productos y métodos usados para realizarla. La exfoliación conducirá a cierta rojez inicial en la piel. Hacia el final de las quimioexfoliaciones, la piel cambiará de color, variando los colores de blanco brillante a gris en la superficie cutánea. Son por lo tanto deseables métodos más eficaces que sean más suaves para la piel.

45 Por tanto sigue existiendo la necesidad de tratamientos adecuados para hidratar la piel y/o para exfoliación de la capa córnea de la piel.

50 Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que determinados polipéptidos y péptidos (por ejemplo partes de polipéptidos) que se encuentran en el líquido de incubación de pescado son hidratantes y exfoliantes notablemente eficaces. La eclosión de embriones de organismos vertebrados ovíparos, por ejemplo, peces, anfibios, aves y reptiles, está facilitada por diversas enzimas, habitualmente conocidas como enzimas de incubación, que son capaces de degradar parcial o completamente las partes proteicas de la cáscara de huevo. Los oocitos de todos los vertebrados tienen envolturas extracelulares características, conocidas como membranas vitelinas, cáscaras de huevos o corion (usados indistintamente en el presente documento), que están compuestos por la reticulación de diversos polipéptidos.

55 Proteasas con diferentes especificidades actúan sobre el corion para ablandar, erosionar y/o romper (es decir degradar) la cáscara de huevo y facilitar la liberación del embrión. Por lo tanto, el líquido liberado del huevo durante el proceso de eclosión y/o el líquido en el que el embrión eclosiona (es decir líquido de incubación) comprende una multitud de polipéptidos y partes de polipéptidos, es decir productos de degradación.

60 Los presentes inventores han determinado que una composición particular de las enzimas de eclosión de pescado y los polipéptidos de cáscara de huevo generados a partir de la degradación de la cáscara de huevo (particularmente partes o fragmentos de dichos polipéptidos de cáscara de huevo), es particularmente adecuada para hidratar la piel y/o para exfoliación de la capa córnea de la piel.

65 La eclosión de embriones se realiza o facilita, al menos en parte, mediante las denominadas enzimas de eclosión. Por ejemplo, las coriolisinas de pescado son habitualmente metaloproteinasas halladas en el líquido de incubación. Las

coriolisinas se encuentran en general en dos formas, a saber, la enzima coriolítica alta (coriolisina H, HCE) y la enzima coriolítica baja (coriolisina L, LCE), que son similares en algunas características estructurales y catalíticas y pertenecen a la familia de la astacina pero con preferencias de sustrato notablemente diferentes. También se han identificado y caracterizado enzimas de incubación con otras actividades catalíticas, por ejemplo serina proteasas.

Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, los ejemplos demuestran que las composiciones que comprenden una combinación de enzimas de eclosión, tanto una metaloproteínasa como una serina proteasa, y partes de proteínas de cáscara de huevo de líquido de incubación de salmónidos tienen capacidad de hidratación de la piel y/o exfoliación de la capa córnea de la piel.

El líquido de incubación de otros peces contiene polipéptidos que son funcionalmente equivalentes a los polipéptidos hallados en el líquido de incubación de salmónidos.

Se cree que la combinación de enzimas de eclosión y productos de degradación de polipéptidos (por ejemplo polipéptidos de cáscara de huevo y partes de dichos polipéptidos) en las composiciones definidas en el presente documento puede interactuar con diferentes tipos de proteínas presentes en la dermis y epidermis de la piel. Se cree que la combinación única de polipéptidos y partes de polipéptidos puede actuar de forma sinérgica y que estas interacciones pueden ser responsables de los efectos de la composición en el tratamiento de diversos trastornos o afecciones cutáneas.

En consecuencia, en su sentido más amplio, puede entenderse que la presente divulgación proporciona una composición que puede obtenerse de líquido de incubación de pescado por un método descrito posteriormente en el presente documento. Dicha composición comprende una metaloproteínasa, una serina proteasa y uno o más polipéptidos de cáscara de huevo y/o partes de dichos polipéptidos. En particular la composición es para su uso en el tratamiento de diversas anomalías, trastornos o afecciones de la piel hidratando y/o exfoliando la piel como se describe posteriormente en el presente documento. En otras palabras, la composición como se describe en el presente documento es para su uso en el tratamiento de afecciones o trastornos tales como sequedad de la piel, piel en la que la capa córnea es más gruesa de lo deseable, por ejemplo en afecciones de hiperqueratosis, o piel con pigmentación indeseable en la epidermis, por ejemplo manchas cutáneas, de la edad, solares u oscuras. En un aspecto particularmente preferido, puede entenderse que la presente divulgación proporciona una composición que puede obtenerse de líquido de incubación, como se describe en el presente documento, para su uso en, o en métodos para, el tratamiento cosmético de piel normal pero seca o engrosamiento de la piel (tal como callos, helomas o verrugas hiperqueratóticas) o tratamiento cosmético de trastornos de pigmentación, tales como manchas cutáneas. En otro aspecto preferido, puede entenderse que la presente divulgación proporciona una composición que puede obtenerse de líquido de incubación, como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento terapéutico de trastornos o afecciones cutáneas, tal como acné, eccema, psoriasis o verrugas que provocan dolor. La composición indicada anteriormente también se denomina en el presente documento "extracto de líquido de incubación". Además de enzimas de eclosión y polipéptidos y péptidos de cáscara de huevo, dicho extracto puede comprender material no proteico nativo.

Resultará evidente a partir de las divulgaciones posteriores que una composición que puede obtenerse de líquido de incubación de pescado, como se describe en el presente documento, puede proporcionarse como una composición farmacéutica o cosmética, que comprende uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Por tanto, en un aspecto la presente invención proporciona un método para preparar una composición farmacéutica o cosmética de líquido de incubación de pescado que comprende al menos las etapas de:

- a) suspender huevos de pescado en un volumen mínimo de agua (por ejemplo equivalente al volumen de los huevos o menos);
- b) inducir eclosión rápida, sincronizada, de dichos huevos, preferentemente de modo 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 líquido de incubación; y
- d) filtrar el líquido de incubación usando un filtro con un tamaño de poro de al menos 5 µm, preferentemente 5-15 µm, y en particular preferentemente un tamaño de poro de 7 µm, y recoger el filtrado, opcionalmente filtrar adicionalmente el filtrado usando un filtro con un tamaño de poro de 0,30-0,60 µm, preferentemente un tamaño de poro de 0,35-0,55 µm, en particular preferentemente 0,40-0,50 µm, lo más preferentemente 0,45 µm, y recoger el filtrado;
- (e) someter el filtrado de la etapa (d) a cromatografía de intercambio iónico que comprende:

- (1) cargar el filtrado en una columna de intercambio iónico de DEAE (dietilaminoetilo);
- (2) lavar la columna con una solución de lavado tamponado a un pH de 7-9, por ejemplo que comprende Tris-HCl 20 mM, pH 8,5;
- (3) eluir polipéptidos de leucolectina de la columna usando un primer tampón de elución que comprende la solución de lavado tamponada que comprende además una sal a una concentración de 50-100 mM, por ejemplo NaCl 50 mM;
- (4) eluir los polipéptidos restantes de la columna usando un segundo tampón de elución que comprende la

solución de lavado tamponada que comprende una concentración salina de 500 mM a 2 M, por ejemplo, NaCl 1 M;

(5) recoger el eluido de la etapa (4);

5 f) cambiar el agua en el eluido de la etapa (5) con un tampón farmacéuticamente (o cosméticamente) aceptable realizando diafiltración usando un filtro con un tamaño de exclusión de menos de 12 kDa;

g) filtrar la solución obtenida de la etapa (f) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 μm , preferentemente un tamaño de poro de 0,22 μm , y recoger el filtrado; y

h) preparar dicha composición farmacéutica o cosmética del filtrado de la etapa (g).

10 Como se indica en el presente documento, el "líquido de incubación" es el líquido liberado de huevos durante el proceso de eclosión y puede estar en una forma en bruto, diluida o filtrada. El líquido de incubación en bruto se refiere a líquido sin diluir, sin tratar. El líquido de incubación diluido se refiere a líquido de incubación que puede haberse mezclado con otro líquido durante o después de la eclosión, por ejemplo cuando se produce eclosión en agua.

15 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica o cosmética obtenida u obtenible por el método descrito en el presente documento.

20 La etapa de someter el filtrado a cromatografía de intercambio iónico de DEAE puede realizarse usando cualquier método adecuado dentro de los parámetros definidos anteriormente que dé como resultado un filtrado en el que los polipéptidos en la composición de la invención (incluyendo partes de la misma como se define posteriormente) están enriquecidos en relación con al menos uno de los otros polipéptidos presentes en el extracto de líquido de incubación antes de la purificación (es decir antes de cromatografía de intercambio iónico). Por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico puede dar como resultado un eluido final (es decir un eluido obtenido usando el segundo tampón de elución) en el que las enzimas de eclosión y polipéptidos de cáscara de huevo en el líquido de incubación están enriquecidos en al menos 5 % en relación con al menos uno de los otros polipéptidos presentes en el líquido de incubación, preferentemente todos los otros polipéptidos, presentes en el extracto de líquido de incubación antes de esta etapa de purificación. Otros polipéptidos pueden definirse como polipéptidos que no quedan dentro de la definición estructural y/o funcional de un polipéptido en la composición para su uso en los métodos de la invención (es decir una enzima de eclosión o polipéptido de cáscara de huevo o parte del mismo) como se define en el presente documento. La composición farmacéutica o cosmética de la invención (es decir obtenida u obtenible por el método descrito en el presente documento) no contiene polipéptidos de leucolectina, que se definen posteriormente. Preferentemente, los polipéptidos son enriquecidos en al menos 10, 20, 30, 40 o 50 % por esta etapa. Especialmente de forma preferente los polipéptidos se purifican hasta un grado de pureza de más de 50 o 60 %, por ejemplo, >70, 80 o 90 %, preferentemente más de 95 o 99 % de pureza en relación con al menos uno de los otros polipéptidos presentes en el extracto de líquido de incubación antes de la purificación, por ejemplo leucolectina. Por tanto, el eluido puede comprender solamente cantidades traza de otros polipéptidos, tales como leucolectina, que están presentes en el líquido de incubación antes de cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, menos de 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, 0,0001 % o 0,00001 % p/p.

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

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

55 Después de la etapa de cargar el líquido de incubación filtrado en la columna de intercambio iónico y, de acuerdo con protocolos convencionales, la columna puede lavarse con un tampón adecuado para retirar componentes no deseados presentes en el líquido de incubación que no se unen a la columna. El lavado comprende aplicar un volumen de tampón de lavado a la columna, habitualmente el volumen de tampón de lavado aplicado a la columna es al menos igual al volumen de la columna de intercambio iónico y puede ser más, por ejemplo al menos 1,5, 2, 3, 4 o 5 veces el volumen de la columna. En algunas realizaciones la etapa de lavado puede repetirse, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o más veces. Puede utilizarse cualquier tampón de lavado adecuado que tenga un pH de 7-9 en el método de la invención. Un tampón de lavado adecuado es uno que no altera significativamente la interacción entre los polipéptidos de interés y la columna de intercambio iónico, por ejemplo, menos de 10 %, por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2 o 1 %, de los polipéptidos de la composición de la invención se retira de la columna de intercambio iónico por cada etapa de lavado. En una realización preferida el tampón de lavado es una solución de Tris-HCl en el intervalo de 10-100 mM, preferentemente 10-50 mM, por ejemplo, 20-30 mM, con un pH en el intervalo de 7-9, por ejemplo 8,5. El flujo continuo de la etapa de lavado puede recogerse, por ejemplo para determinar si son necesarias etapas de lavado adicionales

(por ejemplo ensayadas para determinar la presencia de polipéptidos, polisacáridos, sales, etc. que representan componentes no deseados presentes en el líquido de incubación antes de la purificación) y/o descartarse.

5 La etapa de eluir los polipéptidos de leucolectina de la columna de intercambio iónico (la "primera" etapa de elución) implica la aplicación de una solución a la columna para romper la interacción entre al menos los polipéptidos de leucolectina y la columna de intercambio iónico, es decir un primer tampón de elución. Sin embargo, el primer tampón de elución no es suficiente para romper la interacción entre los polipéptidos de interés y la columna de intercambio iónico, por ejemplo, menos de 10 %, por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2 o 1 %, en total de los polipéptidos de la composición de la invención se retira de la columna de intercambio iónico por la etapa de elución para eluir los polipéptidos de leucolectina. Habitualmente el volumen del primer tampón de elución aplicado a la columna es al menos igual al volumen de la columna de intercambio iónico y puede ser más, por ejemplo al menos 1,5, 2, 3, 4 o 5 veces el volumen de la columna. En algunas realizaciones la "primera" etapa de elución (es decir uso del primer tampón de elución) puede repetirse, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o más veces. El eluido que contiene los polipéptidos de leucolectina (el flujo continuo de la "primera" etapa de elución) puede recogerse de cada etapa de elución. Como alternativa o de modo adicional, el eluido que contiene los polipéptidos de leucolectina se descarta. Un primer tampón de elución adecuado es uno que rompe la interacción entre los polipéptidos de leucolectina y la columna de intercambio iónico, por ejemplo, al menos el 70 %, preferentemente al menos 75, 80, 85, 90, 95 o 99 %, de los polipéptidos de leucolectina unidos a la columna se eluye de la columna por cada etapa de elución.

20 La primera etapa de elución es la misma que el tampón de lavado que comprende también una sal que es capaz de romper la interacción entre los polipéptidos de leucolectina y la columna de intercambio iónico. La sal está presente en el intervalo de 50-100 mM, por ejemplo NaCl 50 mM. Por tanto, en algunas realizaciones el tampón de elución es una solución de Tris-HCl en el intervalo de 50-100 mM, preferentemente 10-50 mM, por ejemplo, 20-30 mM, con un pH en el intervalo de 7-9, por ejemplo 8,5 que también comprende una sal, por ejemplo, NaCl, KCl, etc. en un intervalo como se ha descrito anteriormente.

30 La etapa de eluir los polipéptidos de la composición de la invención de la columna de intercambio iónico (la "segunda" etapa de elución o etapa de elución "final") implica la aplicación de una solución a la columna para romper la interacción entre los polipéptidos de interés y la columna de intercambio iónico. Habitualmente el volumen del tampón de elución aplicado a la columna es al menos igual al volumen de la columna de intercambio iónico y puede ser más, por ejemplo al menos 1,5, 2, 3, 4 o 5 veces el volumen de la columna. En algunas realizaciones la "segunda" etapa de elución (es decir uso del segundo tampón de elución) puede repetirse, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o más veces. El eluido puede recogerse de cada etapa de elución y uno o más de los eluidos pueden combinarse antes de la etapa de intercambio del agua en el eluido. Un tampón de elución adecuado es uno que rompe la interacción entre los polipéptidos de la composición de la invención y la columna de intercambio iónico, por ejemplo, al menos el 70 %, preferentemente al menos 75, 80, 85, 90, 95 o 99 %, de los polipéptidos de la composición de la invención unidos a la columna se eluye de la columna por cada "segunda" etapa de elución.

40 La segunda etapa de elución es la misma que el tampón de lavado que comprende también una sal capaz de romper la interacción entre los polipéptidos de interés y la columna de intercambio iónico. La sal está presente en el intervalo de 500-2000 mM, preferentemente 600-1800 mM, 700-1700 mM, 800-1500 mM o 900-1200 mM, por ejemplo aproximadamente NaCl 1000 mM. Por tanto, en algunas realizaciones el segundo tampón de elución es una solución de Tris-HCl en el intervalo de 500-2000 mM, con un pH en el intervalo de 7-9, por ejemplo 8,5 que también comprende una sal, por ejemplo, NaCl, KCl, etc. en un intervalo como se ha descrito anteriormente.

45 La etapa de intercambio del agua en el filtrado puede realizarse usando diafiltración usando un filtro con un tamaño de exclusión de menos de 12 kDa, preferentemente 10 kDa o menos, por ejemplo 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 kDa o menos.

50 La diafiltración usa membranas de ultrafiltración para retirar por ejemplo sales u otros microsolutos no deseables de una solución o como un modo de intercambiar el disolvente, por ejemplo tampón, de una solución. Las moléculas pequeñas se separan de una solución conservando al mismo tiempo moléculas mayores en el material retenido (el material que no pasa a través del filtro). Los microsolutos y disolventes, por ejemplo, agua, se lavan en general fácilmente a través de la membrana. Habitualmente aproximadamente 3 volúmenes de disolvente de diafiltración (por ejemplo solución salina tamponada con fosfato) eliminarán 95 % del microsolutos. Por tanto, el filtrado anterior, es decir eluido, de la etapa (5) se procesa inicialmente por diafiltración y esto da como resultado la concentración del material retenido a medida que una proporción de la solución (que contiene las impurezas solubles/fracción no deseada del líquido de incubación) pasa a través de la membrana. El material retenido se diluye después con un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo fosfato de sodio 0,5 mM y cloruro de sodio 1 mM, solución salina tamponada con fosfato, etc. El material retenido diluido puede someterse a ciclos de diafiltración repetidos, si es necesario. Habitualmente, antes de la etapa (g) el material retenido se diluye de modo que el filtrado de la etapa (g) tenga una actividad enzimática de 25000-45000 mU/l, preferentemente 25000-35000 mU/l y lo más preferentemente aproximadamente 30000 mU/l. La actividad enzimática del filtrado puede medirse por la capacidad del filtrado para escindir el sustrato cromógeno del Factor Xa (CH₃OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH, número de producto de Sigma aldrich: F3301-25MG). Antes de la etapa de diafiltración el líquido de incubación puede comprender una actividad enzimática en el intervalo de 90 a 1.300.000 mU/l. Una unidad (1U) puede definirse como la cantidad de la enzima necesaria para catalizar la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto.

El sustrato cromogénico del Factor Xa (Sigma-Aldrich) es escindido por la enzima serina proteasa presente en el líquido de incubación produciendo un producto amarillo que puede medirse convenientemente usando análisis espectrofotométrico a una longitud de onda de 405 nm. Un ensayo habitual comprende la adición de 100 µl de solución de líquido de incubación, que puede obtenerse de la etapa (d) o (f) del método anterior, a 600 µl de solución de sustrato, que comprende 10 µl de sustrato cromogénico de Factor Xa (10 mg/ml en agua milli-q o destilada), 70 µl de Tris-HCl 0,2 M pH 8,5 y 520 µl de dH₂O. Convenientemente el cambio de la absorbancia puede medirse durante 5-20 minutos (o hasta una hora para muestras con baja actividad enzimática), habitualmente 10 minutos. El resultado se multiplica por un factor apropiado, por ejemplo 10 (para un ensayo de 10 minutos) para obtener la actividad enzimática por cada 1 ml de muestra. Pueden usarse otros sustratos apropiados y equivalentes para determinar la actividad del líquido de incubación.

Como se ha mencionado anteriormente, es ventajoso sincronizar la etapa de eclosión de huevo para maximizar la cantidad de líquido de incubación obtenido, particularmente la cantidad de los polipéptidos deseados o partes de los mismos en el líquido de incubación, para la purificación. Puede conseguirse eclosión sincronizada mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, algunos huevos pueden sincronizarse usando fotomanipulación, por ejemplo transfiriendo huevos de la luz (que inhibe la eclosión) a condiciones sin luz. La manipulación de la temperatura de los huevos, por ejemplo la temperatura de la solución en la que eclosionan los huevos, desoxigenación del ambiente de eclosión, por ejemplo desoxigenación de la solución en la que eclosionan los huevos (Oppen-Berntsen *et al.* 1990, Aquaculture, 86, págs. 417-430), aumento de la cantidad de dióxido de carbono en el ambiente de eclosión y estimulación de los huevos usando electricidad también pueden usarse para provocar la eclosión sincronizada. En algunas realizaciones, puede conseguirse eclosión sincronizada usando feromonas, por ejemplo feromonas peptídicas capaces de afectar a, es decir estimular, el desarrollo embrionario y la eclosión. Como se ha señalado anteriormente, los huevos se suspenden en un volumen mínimo de agua, que puede ser equivalente al volumen de los huevos o menor, por ejemplo para cada 1 ml de huevos puede usarse un líquido de suspensión de ≤1, 0,75, 0,5, 0,25 ml, por ejemplo de 0,5 a 1 ml. En algunas realizaciones puede ser ventajoso diluir el líquido de incubación para facilitar las etapas de purificación posteriores, por ejemplo para reducir la viscosidad del líquido de incubación. Por tanto, el método puede comprender una etapa adicional de dilución del líquido de incubación. Preferentemente el filtrado puede diluirse por 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 10000.

En realizaciones preferidas la eclosión sincronizada, rápida 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. Asimismo, en algunas realizaciones la eclosión se contempla en 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, 97, 98 o 99 % de los embriones.

El método para preparar una composición farmacéutica o cosmética descrita anteriormente da como resultado una preparación enriquecida que está de forma preferente sustancialmente exenta de cualquier componente contaminante procedente del material fuente o material usado en el procedimiento de aislamiento, por ejemplo componentes distintos de los polipéptidos o partes de polipéptidos comprendidos en el líquido de incubación en bruto. Otros componentes contaminantes incluyen polipéptidos de leucolectina. En una realización preferida la composición puede enriquecerse en un grado de pureza de más de 30, 40, 50 o 60 %, por ejemplo, >70, 80 o 90 %, de pureza evaluada p/p (peso seco) de los polipéptidos y partes de polipéptidos de interés en comparación con el líquido de incubación de partida, es decir 90 % de pureza se refiere a una pérdida de 90 % del material de partida (componentes contaminantes) durante el transcurso del método de preparación. Sin embargo, pueden usarse composiciones que tienen menor pureza, por ejemplo, conservan más del 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % del material de partida. Sin embargo, incluso composiciones de pureza menor no contienen péptidos de leucolectina, es decir menos de 0,0005 % [p/p], preferentemente menos de 0,0001, 0,00005 o 0,00001 % [p/p].

Aunque el filtrado de la etapa (g) puede en sí mismo formar una composición farmacéutica o cosmética, opcionalmente el producto (el filtrado de la etapa (g)) obtenido o que puede obtenerse del método anterior puede diluirse (o concentrarse) hasta una concentración apropiada en la etapa (h) para producir la composición farmacéutica o cosmética y/o antes de su uso en los métodos y usos de la invención. Por tanto, el método puede comprender una etapa adicional de dilución (o concentración) de la composición. Preferentemente el filtrado puede diluirse (o concentrarse) por un factor de al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 1000, 5000 o 10000. De forma particularmente preferente la composición final comprende 0,5-10 %, por ejemplo 0,5-5 %, preferentemente 0,5-3 % (por ejemplo 1 o 3 %) del filtrado de la etapa (g). En una realización particularmente preferida, la solución de la etapa (f) del método anterior se diluye o concentra para conseguir una solución con una actividad enzimática de 10000-100000 mU/l como se mide por el método descrito anteriormente. Preferentemente, la solución, y por lo tanto el filtrado de la etapa (f) comprende una actividad de 20000-90000, 25000-80000, 25000-60000, 25000-50000, 25000-45000 o 25000-35000 mU/l. Más preferentemente la solución comprende una actividad de aproximadamente 30000 mU/l.

Opcionalmente, uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables pueden añadirse a la composición obtenida o que puede obtenerse del método anterior. Por tanto, la etapa (h) para preparar una composición farmacéutica o cosmética del filtrado de la etapa (g) puede comprender una etapa de añadir uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables a la composición o combinar la composición con uno o más

excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las etapas del método de preparación alternativa o adicional incluyen cambiar o modificar el disolvente, por ejemplo pH, concentración de iones, etc.

Otros componentes o ingredientes farmacéuticamente aceptables pueden añadirse a la composición obtenida o que puede obtenerse del método anterior por ejemplo durante la etapa (h). El o los componentes adicionales pueden ser componentes activos, es decir componentes que tienen un efecto en la piel, preferentemente que también son útiles en el tratamiento de una afección o trastorno de la piel, por ejemplo en las afecciones o trastornos descritos en el presente documento. Por tanto, como alternativa o de modo adicional, 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 (h). Los componentes activos farmacéuticamente aceptables pueden incluir minerales, vitaminas, enzimas, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, antioxidantes, polisacáridos, sustancias adecuadas como filtros protectores solares, exfoliantes químicos, extractos y mezclas de los mismos, como se describe con mayor detalle a continuación.

La composición farmacéutica o cosmética obtenida o que puede obtenerse a partir de los métodos anteriores es adecuada para su uso en los métodos de la invención, como se describe en otras partes del presente documento.

La composición farmacéutica o cosmética de la invención comprende una combinación de enzimas de eclosión y polipéptidos de cáscara de huevo o partes de polipéptidos que son particularmente útiles en el tratamiento de diversas afecciones o trastornos cutáneos.

En particular, las composiciones de la invención comprenden una enzima de eclosión con actividad metaloproteínasa, una enzima de eclosión con actividad serina proteasa y uno o más polipéptidos de cáscara de huevo o partes de los mismos, preferentemente en donde dichas partes son estructuralmente equivalentes a partes generadas por escisión proteolítica de la cáscara de huevo o corion polimerizado y reticulado por enzimas de eclosión durante la eclosión. Los polipéptidos pueden denominarse en el presente documento polipéptidos de interés.

La secuencia de una metaloproteínasa que puede estar presente en las composiciones de la invención se presenta en la SEQ ID NO: 1.

Una serina proteasa ilustrativa que puede estar presente en la composición de la invención puede definirse como un polipéptido con un peso molecular de aproximadamente 28 kDa que tiene las siguientes propiedades:

- a) escinde la cromozima X;
- b) es inhibido por benzamidina;
- c) escinde enlaces peptídicos con arginina;
- d) permanece activo en presencia de urea 8M, concentraciones molares de sal, agua destilada y disolventes orgánicos, preferentemente dioxano o propanol; y
- e) conserva actividad enzimática en solución a temperatura ambiente durante 50 días.

Preferentemente la serina proteasa puede obtenerse en una forma purificada por un método que comprende las etapas de:

- a) suspender huevos de pescado, por ejemplo salmón, en un volumen mínimo de agua;
- b) inducir eclosión rápida, sincronizada, de dichos huevos;
- c) filtrar los huevos eclosionados para obtener líquido de incubación;
- d) añadir urea sólida a dicho líquido de incubación para permitir la disociación de fragmentos de cáscara de huevo y someter dicho líquido a centrifugación a baja velocidad;
- e) purificar adicionalmente dicha serina proteasa sometiendo el sobrenadante de centrifugación a filtración en gel; y
- f) purificar adicionalmente dicha serina proteasa por cromatografía de afinidad en una columna de Superose 6B® modificada con benzamidina, en donde dicha cromatografía de afinidad se realiza mediante lavados salinos concentrados seguidos de elución con dioxano, en solución salina concentrada, para extraer polipéptidos con actividad serina proteasa unidos a la matriz de cromatografía o a estructuras macromoleculares.

Los polipéptidos de cáscara de huevo son proteínas estructurales que se reticulan para formar el corion. Están presentes polipéptidos de cáscara de huevo y partes de los mismos en el líquido de incubación por la degradación de la cáscara de huevo. En algunas realizaciones, los polipéptidos de cáscara de huevo hallados en la composición de la invención son preferentemente ácidos o muy ácidos, por ejemplo tienen un pI de 3 a 5,5, preferentemente de 3,5 a 5,2.

Los polipéptidos de cáscara de huevo aparecen en líquido de incubación en diversas formas, particularmente en forma de partes o fragmentos de los polipéptidos de longitud completa. Ya que los polipéptidos de cáscara de huevo de longitud completa comprenden las partes que están presentes en líquido de incubación se prevé que tanto polipéptidos de cáscara de huevo de longitud completa como partes de los mismos encuentren utilidad en la presente invención. Asimismo, se han identificado diversas isoformas de polipéptidos de cáscara de huevo y sus partes en líquido de

incubación.

Se desvelan en el presente documento tres polipéptidos de cáscara de huevo ilustrativos que pueden estar presentes en las composiciones de la invención. Las secuencias de algunos polipéptidos de cáscara de huevo hallados en líquido de incubación se han determinado por espectroscopia de masas y se presentan en las SEQ ID NO: 2-4. Estas secuencias representan partes o fragmentos de polipéptidos procedentes de los polipéptidos de cáscara de huevo de longitud completa, que se presentan en las SEQ ID NO: 8, 6 y 7, respectivamente. Por lo tanto, las SEQ ID NO: 2-4 pueden definirse como partes de polipéptidos de cáscara de huevo como se definen en el presente documento.

Como se ha analizado anteriormente, cada polipéptido de cáscara de huevo o parte del mismo puede existir en diversas isoformas.

Por tanto, los componentes de la composición farmacéutica o cosmética obtenida o que puede obtenerse por el método descrito anteriormente puede definirse como:

- (i) una metaloproteinasa que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos 70 % idéntica a dicha secuencia;
- (ii) una serina proteasa que puede obtenerse por el método descrito anteriormente; y
- (iii) un polipéptido de cáscara de huevo seleccionado de uno cualquiera o más de:

- (a) un polipéptido de cáscara de huevo que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia que es al menos 70 % idéntica a dicha secuencia;
- (b) un polipéptido de cáscara de huevo que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que es al menos 70 % idéntica a dicha secuencia; y
- (c) un polipéptido de cáscara de huevo que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que es al menos 70 % idéntica a dicha secuencia; o

- (iv) una parte de cualquiera de los polipéptidos definidos en (i) a (iii) teniendo dicha parte una longitud como se describe posteriormente en el presente documento;

y uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. (Dicha identidad de secuencia de al menos 70 % es preferentemente al menos 80, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad.)

Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones pueden existir en la composición secuencias más largas que las presentadas en las SEQ ID NO: 2-4. Por tanto, en la lista anterior, las SEQ ID NO: 2-4 pueden reemplazarse con las SEQ ID NO: 5-7, respectivamente y en donde la SEQ ID NO: 2 puede como alternativa reemplazarse con la SEQ ID NO: 8.

Como se ha mencionado anteriormente, la composición farmacéutica o cosmética descrita en el presente documento no comprende un polipéptido de leucolectina funcional o una parte funcional del mismo. Un polipéptido de leucolectina puede definirse como un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12 o una secuencia que es al menos 50 % idéntica a dicha secuencia, o una parte de cualquiera de dichas secuencias.

Un polipéptido de leucolectina funcional es un polipéptido que es capaz de inhibir la liberación de metaloproteinasas de la matriz (MMP), que son endopeptidasas dependientes de cinc, de fibroblastos dérmicos. Por lo tanto, puede considerarse que un polipéptido que queda dentro de la definición estructural de un polipéptido de leucolectina definido anteriormente es un polipéptido de leucolectina no funcional si tiene menos de 50, 40, 30, 20, 10 o 5 % de la actividad de una leucolectina funcional, por ejemplo una cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12, como se define por la capacidad de los polipéptidos para inhibir la liberación de MMP en cultivos celulares *in vitro*. Expresado de manera alternativa, un polipéptido de leucolectina funcional debe tener al menos 50, 70 o 90 % de la actividad de una leucolectina funcional, por ejemplo una cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12, como se define por la capacidad de los polipéptidos para inhibir la liberación de MMP en cultivos celulares *in vitro*.

La concentración total de los polipéptidos o partes de los mismos definidos en el presente documento en las composiciones definidas en el presente documento puede variar. Sin embargo, en una realización preferida la proporción de cada tipo de polipéptido o grupos de polipéptidos es uniforme para todas las composiciones, es decir independientemente de la concentración total del polipéptido. En realizaciones particularmente preferidas, la proporción de polipéptidos definidos anteriormente en el presente documento en la composición como un porcentaje de los polipéptidos totales en la composición puede definirse como:

- (i) de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,20 % [p/p], preferentemente de aproximadamente 0,100 % a aproximadamente 0,125 %, tal como de aproximadamente 0,108 % p/p a aproximadamente 0,112 % p/p;
- (ii) de aproximadamente 0,15 % a aproximadamente 0,40 % [p/p] de serina proteasa, preferentemente de aproximadamente 0,255 % a aproximadamente 0,310 %, tal como de aproximadamente 0,275 % a aproximadamente 0,290 % de serina proteasa; y

(iii) de aproximadamente 99,40 % a aproximadamente 99,80 % [p/p] de polipéptidos de cáscara de huevo totales o partes de dichos polipéptidos, preferentemente de aproximadamente 99,575 % a aproximadamente 99,645 %, tal como de aproximadamente 99,598 % a aproximadamente 99,617 % de polipéptidos de cáscara de huevo totales o partes de dichos polipéptidos.

Como se indica en el presente documento dichos polipéptidos de cáscara de huevo totales o partes de los mismos incluyen tanto polipéptidos de cáscara de huevo definidos anteriormente en el presente documento como otras proteínas de cáscara de huevo muy ácidas que pueden obtenerse por precipitación de polipéptidos asociados con cáscaras de huevos con 4 veces el volumen de acetona y tienen un *pI* de 3 a 5,5.

Por tanto, la proporción de un polipéptido de cáscara de huevo cualquiera o parte de dicho polipéptido en la composición de la invención puede ser de aproximadamente 0-99,80 % [p/p] de los polipéptidos totales en la composición, tal como 1-95 %, un 2-90 %, un 3-85 %, un 4-80 %, un 5-75 %, un 10-70 %, un 15-65 %, un 20-55 %, 25-50 % o 30-40 %, en donde la proporción total de polipéptidos de cáscara de huevo o partes de dichos polipéptidos en la composición no supera 99,80 % de los polipéptidos totales en la composición. Preferentemente, la proporción total de polipéptidos de cáscara de huevo o partes de dichos polipéptidos en la composición no supera 99,617 % de los polipéptidos totales en la composición.

Las referencias a una composición farmacéutica en el presente documento pueden entenderse como inclusivas de composiciones cosméticas.

Los "polipéptidos" como se indican en el presente 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 de los mismos. Como se indica en el presente documento una "parte" comprende preferentemente 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 procede. Dicha parte puede obtenerse de una parte central o N terminal o C terminal de la secuencia. Preferentemente dicha parte se obtiene del extremo N terminal, por ejemplo de los primeros 50, 100 o 150 restos del polipéptido. Como alternativa se prefieren partes obtenidas del extremo C terminal, por ejemplo de los últimos 50, 100 o 150 restos del polipéptido.

Preferentemente las secuencias polipeptídicas definidas en el presente documento son al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticas a la secuencia (SEQ ID NO: 1-12) con la que se comparan.

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

Preferentemente dichos polipéptidos relacionados por identidad de secuencia son funcionalmente equivalentes a los polipéptidos que se exponen en los números de secuencia enumerados. Dichos polipéptidos funcionalmente equivalentes pueden tomar la forma de derivados como se exponen posteriormente.

Asimismo, las "partes" como se describen en el presente documento pueden ser equivalentes funcionales. Preferentemente estas partes satisfacen las condiciones de identidad (en relación con una región comparable) mencionadas en el presente documento.

Como se indica en el presente documento, para conseguir "equivalencia funcional" el polipéptido puede mostrar algo de eficacia reducida en la realización de la actividad enzimática y/o función farmacéutica o cosmética en relación con la molécula parental (es decir la molécula con la que está relacionada por identidad de secuencia), pero preferentemente es tan eficaz o más. Por tanto, la equivalencia funcional se refiere a un polipéptido que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o una afección de la piel como se describe posteriormente en el presente documento. Esto puede ensayarse por comparación de los efectos del polipéptido derivado (es decir con secuencia relacionada) en relación con el polipéptido con el que está relacionado de una manera cualitativa o cuantitativa, por ejemplo realizando los análisis *in vivo* indicados en los ejemplos. Cuando son posibles resultados cuantitativos, el derivado tiene al menos 30, 50, 70 o 90 % de eficacia del polipéptido parental. Como alternativa o de modo adicional, puede realizarse ensayo *in vitro*, por ejemplo mediante análisis de la capacidad de las enzimas de eclosión para escindir sustratos polipeptídicos o peptídicos adecuados, tales como el Factor X, por ejemplo sustratos de metaloproteína o serina proteasa.

Son variantes funcionalmente equivalentes particularmente preferidas variaciones biológicas naturales (por ejemplo variantes alélicas o variaciones geográficas dentro de una especie o como alternativa en diferentes géneros, por ejemplo, peces).

En consecuencia, en una realización preferida, los peces adecuados, particularmente huevos de pescado, de los que pueden obtenerse las composiciones de la invención (es decir material de partida de los que pueden obtenerse

polipéptidos contenidos en las composiciones y las composiciones de la invención) incluyen cualquier pez de la infraclase *Teleostei*, que es una de tres infraclases de la clase *Actinopterygii*. Por lo tanto, el pez puede seleccionarse de un pez de cualquier superorden seleccionado de la lista que consiste en *Osteoglossomorpha*, *Elopomorpha*, *Clupeomorpha*, *Ostariophysii*, *Protacanthopterygii*, *Stenopterygii*, *Cyclosquamata*, *Scopelomorpha*, *Lampridiomorpha*, *Polymixiomorpha*, *Paracanthopterygii* y *Acanthopterygii*.

En algunas realizaciones, el pez puede seleccionarse de 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*, *Argentiniiformes*, *Salmoniformes*, *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 el pez puede seleccionarse de un pez de cualquier orden seleccionado de la lista que consiste en *Salmoniformes*, *Cypriniformes*, *Perciformes*, *Siluriformes*, *Mugiliformes* y *Acipenseriformes*.

En realizaciones particularmente preferidas el pez puede seleccionarse de un pez de cualquier familia seleccionada de la lista que consiste en *Salmonidae*, *Cyprinidae*, *Cichlidae*, *Pangasiidae*, *Sciaenidae*, *Serranidae*, *Carangidae*, *Sparidae*, *Lateolabracidae*, *Moronidae*, *Mugilidae*, *Latidae*, *Eleotridae* y *Acipenseridae*.

Por tanto, en algunas realizaciones, el pez puede ser un *Osteoglossiforme*, un *Hiodon tergisus*, un *Hiodon alosoides*, un malacho, un tarpón, un macabijo, un halosáurido, una anguila espinosa, una anguila verdadera, un pez pelícano, un *Saccopharyngiforme*, un arenque, una anchoa, un chanos, un barbo, una carpa, un danio, un pez dorado, una locha, un foxino, una rásbora, un carácido, un *Nannostomus*, un pez hacha, una piraña, un tetra, una anguila eléctrica, un pez cuchillo, un siluro, un pez duende, un alepocefálico, un salmón, una trucha, un lucio, un eperlano, un galáxico, un ateleopólido, un gonostomátido, un pez hacha marino, un *Harpadon nehereus*, un lanzón, un pez linterna, un pez remo, una luna real, un listoncillo, un *Polymixia*, un pez cavernícola, una trucho-perca, un sapo, un rape, un bacalao, un pez de cristal, una arawana plateada, una lisa, un pejerrey, un melanoténido, un pez volador, un pez ballena, un pez vivíparo, un ciprinodóntido, un melánfido, un anoplogástrido, un monocéntrico, un pez de San Pedro, un gobiesócido, un espinoso, un pez aguja, un caballito de mar, un sinbránquido, un pez ballesta, un pez globo, un pez plano, un escorpénido, un escorpión, un anabántido, una lubina, un cíclido, un gobio, un guramí, una caballa, una perca, un escatófago, un merlango o un lábrido.

En realizaciones particularmente preferidas el pez puede ser de cualquier especie seleccionada de carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), Catla (*Catla catla*), carpa común (*Cyprinus carpio*), carpa cabezona (*Hypophthalmichthys nobilis*), carpín (*Carassius carassius*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus niloticus*), *Pangasius pangasius*, rohu (*Labeo rohita*), salmón atlántico (*Salmo salar*), corvina japonesa (*Larimichthys crocea*), mero lutra (*Epinephelus tauvina*), trucha marina (*Salmo trutta trutta*), pez limón del Japón (*Seriola quinqueradiata*), dorada (*Sparus aurata*), serrano japonés (*Lateolabrax japonicus*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Chrysophrys auratus*), mágil (*Mugil cephalus*), perca gigante (*Lates calcarifer*), gobio de mármol (*Oxyeleotris marmorata*), tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), trucha asalmonada (*Oncorhynchus mykiss*), salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*), salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*), salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*), salmón chum (*Oncorhynchus keta*), salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), esturión siberiano (*Acipenser baerii*) y esturión del Danubio (*Acipenser gueldenstaedtii*).

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas o cosméticas pueden obtenerse ser obtenibles de líquido de incubación de más de un tipo de pez, particularmente más de un tipo de huevo de pescado, es decir huevos de pescado de uno cualquiera o más de los peces definidos anteriormente. Por ejemplo, el líquido de incubación de dos o más tipos de huevo de pescado podría usarse en el método descrito en el presente documento para obtener la composición farmacéutica o cosmética de la invención. Por lo tanto, el método de la invención puede incluir una etapa de combinar el líquido de incubación recogido de los huevos eclosionados de uno o más organismos, por ejemplo antes o después de la filtración.

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

Los principios activos, es decir los componentes polipeptídicos de la composición que pueden obtenerse por el método descrito anteriormente, para administración pueden modificarse de forma apropiada para su uso en una composición farmacéutica o cosmética. Por ejemplo la composición usada de acuerdo con la invención puede estabilizarse contra la degradación por ejemplo mediante el uso de aditivos apropiados tales como sales o no electrolitos, acetato, SDS, EDTA, tampones de citrato o acetato, manitol, glicina, HSA o polisorbato.

Los componentes polipeptídicos obtenidos o que pueden obtenerse por los métodos descritos en el presente documento pueden estar presentes en las composiciones para los usos terapéuticos o cosméticos como los únicos principios activos o pueden combinarse con otros ingredientes, en particular otros principios activos, por ejemplo aumentar el efecto terapéutico o cosmético (como se ha descrito anteriormente) o para hacer la composición más atractiva para el consumidor.

La composición descrita en el presente documento también puede comprender impurezas, por ejemplo después de la preparación de dicha composición de una de las fuentes naturales descritas anteriormente. En composiciones como se describen en el presente documento, los diversos polipéptidos o partes de polipéptidos que pueden obtenerse de líquido de incubación de pescado (es decir componente polipeptídico total) pueden estar presentes (en combinación) en el intervalo de 0,001 a 50 % p/p de la composición preparada según el método descrito anteriormente (o 10-100 veces menor si la composición se diluye en la etapa (h)). Preferentemente dichos polipéptidos o partes de polipéptidos que pueden obtenerse de líquido de incubación de pescado están presentes (en combinación) en un intervalo de 0,0005 a 10 % p/p de la composición (o hasta 10-40 %), por ejemplo de 0,001 a 5 %, de 0,001 a 3 %, de 0,001 a 2 %, de 0,001 a 1 %, de 0,001 a 0,5 %, de 0,001 a 0,15 % p/p de la composición preparada según el método anterior (por ejemplo a 0,05-0,5 % p/p o 0,0005-0,005 % p/p si se diluye en la etapa final). En consecuencia, los polipéptidos individuales o partes de polipéptidos que pueden obtenerse de líquido de incubación de pescado pueden estar presentes en el intervalo de 1×10^{-5} a 10 % p/p de la composición. En algunas realizaciones dichos polipéptidos individuales o partes de polipéptidos que pueden obtenerse de líquido de incubación de pescado pueden estar presentes en el intervalo de 1×10^{-5} a 5 % p/p de la composición, por ejemplo de 1×10^{-5} a 4 %, de 1×10^{-5} a 3 %, de 1×10^{-5} a 2 %, de 1×10^{-5} a 1 %, de 1×10^{-4} a 0,5 %, de 1×10^{-4} a 0,15 %, de 1×10^{-4} a 0,1 % o de 1×10^{-4} a 0,01 % p/p de la composición farmacéutica o cosmética si no se diluye adicionalmente en la etapa (h), o reducidos en un factor, por ejemplo, 10-200, por ejemplo, 30-100 si se diluye en la etapa (h).

La proporción de los polipéptidos o partes de polipéptidos que pueden obtenerse de líquido de incubación de pescado en las composiciones puede definirse en relación con los otros solutos en la composición, es decir excluyendo disolventes, por ejemplo, agua. Por tanto, dichos polipéptidos o partes de polipéptidos, en combinación, pueden estar presentes en el intervalo de 1-100 % p/p de la masa seca de la composición. En algunas realizaciones los polipéptidos o partes de polipéptidos, en combinación, pueden estar presentes en el intervalo de 1-90 % p/p de la masa seca de la composición, por ejemplo 5-80 %, 10-75 %, 20-70 %, 30-65 % p/p, por ejemplo aproximadamente 68 o 69 % p/p, de la masa seca de la composición. Por tanto, polipéptidos individuales o partes de polipéptidos pueden estar presentes en el intervalo de 0,001 a 80 % p/p de la masa seca de la composición, por ejemplo de 0,0001 a 75 %, de 0,001 a 70 %, de 0,01 a 60 % p/p, de 0,05 a 50 % p/p de la masa seca de la composición. Como se describe en el presente documento la composición puede diluirse para su uso según la invención en la etapa (h).

En un aspecto adicional de la invención, las composiciones como se describen en el presente documento son para su uso en terapia.

Como se ha mencionado anteriormente, los polipéptidos o partes de dichos polipéptidos en la composición de la invención muestran propiedades terapéuticas en el tratamiento de anomalías, trastornos o afecciones cutáneas, hidratando y/o exfoliando la piel.

Las anomalías, afecciones o trastornos cutáneos preferidos para tratar son sequedad de la piel, piel en la que la capa córnea es más gruesa de lo deseable, por ejemplo en afecciones de hiperqueratosis, o piel con pigmentación indeseable en la epidermis, por ejemplo manchas cutáneas, de la edad, solares u oscuras. Los tratamientos pueden ser cosméticos, por ejemplo el tratamiento de piel normal pero seca o engrosamiento de la piel (tal como callos, helomas o verrugas hiperqueratóticas) o tratamiento de trastornos de pigmentación, tales como manchas cutáneas, o terapéuticos, por ejemplo para tratar el acné, eccema, psoriasis o verrugas que provocan dolor.

Como se indica en el presente documento, un "trastorno" se refiere a una alteración patológica subyacente en un organismo sintomático o asintomático en relación con un organismo normal, que puede resultar, por ejemplo, de infección o una imperfección genética adquirida o congénita. Una "anomalía" o "afección" se refiere a una irregularidad o un defecto en la piel en relación con piel óptima normal pero que no es el resultado de una alteración patológica. El defecto/irregularidad puede resultar en su lugar de la edad, lesión, factores ambientales, niveles hormonales, medicación, materiales aplicados por vía externa o ingeridos, condiciones genéticas o una diversidad de factores adicionales que conducen al funcionamiento anómalo de la piel que da como resultado irregularidades.

El trastorno, anomalía o afección puede ser únicamente cosmético o no cosmético que requiera tratamiento médico, o una combinación de los mismos.

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

Un ingrediente "no cosmético" (o médico) usado en tratamientos médicos como se describe en el presente documento sirve para curar, mitigar, tratar o prevenir uno o más síntomas del trastorno, por ejemplo dolor o incomodidad.

La base de los tratamientos descritos en el presente documento es los efectos hidratantes y exfoliantes de la piel de las enzimas de eclosión y polipéptidos de cáscara de huevo como se desvelan en el presente documento. Estos efectos se han mostrado en los ejemplos proporcionados en el presente documento.

5 Por tanto se contemplan tratamientos basados en las propiedades hidratantes y/o de exfoliación de composiciones que comprenden enzimas de eclosión y polipéptidos de cáscara de huevo.

10 La invención proporciona por tanto un método cosmético de exfoliación y/o hidratación de la piel de un animal, en donde se administra una composición cosmética o farmacéutica como se ha descrito anteriormente en el presente documento a dicho animal.

15 Por tanto, en referencia a lo anterior, la presente invención proporciona un método cosmético de exfoliación y/o hidratación de la piel de un animal, en donde se administra una composición cosmética o farmacéutica a dicho animal, en donde dicha composición se obtiene o puede obtenerse por el método descrito en el presente documento.

20 Como se indica en el presente documento, "exfoliación" se refiere a retirar células superficiales de una superficie de epitelio que en la piel equivale a raspado o descamación de la capa córnea de la epidermis. "Hidratar" como se indica en el presente documento abarca hidratantes que evitan la pérdida de agua de la piel así como hidratantes (humectantes) que atraen y retienen agua cuando se aplica a la piel y emolientes (que mejoran la descamación defectuosa).

Dicho de manera alternativa, la presente invención proporciona una composición cosmética o farmacéutica como se describe en el presente documento para su uso en la exfoliación y/o hidratación de la piel de un animal.

25 Como se ha mencionado anteriormente, dichas propiedades de exfoliación y/o hidratación son ventajosas para tratar o prevenir una diversidad de anomalías, trastornos o afecciones cutáneas.

30 En un aspecto preferido, la anomalía, afección o trastorno cutáneo para tratar o prevenir es sequedad de la piel. Este puede tratarse mediante hidratación y/o exfoliación.

35 La "sequedad de la piel" como se indica en el presente documento se refiere a una epidermis que carece de humedad o sebo, con frecuencia caracterizada por un patrón de líneas finas, descamación y prurito. La sequedad de la piel puede aparecer como una afección cutánea en sí misma (por ejemplo debido a la edad, daño por calor/frío/sequedad) o puede ser el síntoma de un trastorno o afección cutáneo tal como daño por el sol, eccema, dermatitis de contacto, psoriasis o ictiosis (una afección heredada que provoca descamación notable de la piel).

En un aspecto preferido adicional, la anomalía, afección o trastorno para tratar o prevenir es capas córneas engrosadas de la piel. Este puede tratarse mediante hidratación y/o exfoliación.

40 Dichas capas córneas engrosadas de la piel pueden aparecer en afecciones tales como callos o helomas que son almohadillas protectoras compuestas de la capa superior engrosada de la piel debido a roce repetido del área o verrugas en la piel. Dichos métodos también pueden usarse para tratar o prevenir el acné que implica queratinización en su patología. Las capas córneas engrosadas de la piel pueden ser la afección en sí misma o pueden ser un síntoma de la afección o trastorno cutáneo.

45 En un aspecto preferido adicional, la anomalía, afección o trastorno para tratar o prevenir es un trastorno o anomalía de la pigmentación de la piel. Este puede tratarse mediante exfoliación.

50 Los trastornos o anomalías de la pigmentación de la piel pueden producirse como resultado de la edad, cambios hormonales, factores genéticos, enfermedad o el sol u otro daño. La pigmentación alterada puede resultar de un exceso local de melanocitos o aumentos de la actividad de los melanocitos, o ambos. Los trastornos de la pigmentación incluyen manchas cutáneas, solares o de la edad (léntigo solar) y otras imperfecciones tales como pecas.

55 Dicho de manera alternativa, la presente invención proporciona por tanto un método cosmético para tratar o prevenir una afección o trastorno de la piel de un animal en donde dicha piel está anormalmente seca, la capa córnea de la piel está anormalmente engrosada o la piel tiene un trastorno de la pigmentación, en donde se administra una composición cosmética o farmacéutica como se ha descrito anteriormente en el presente documento a dicho animal. Dichas afecciones o trastornos son preferentemente como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

60 Como se indica en el presente documento, "anómalo" se determina en relación con piel óptima normal, es decir, piel sana, hidratada, con pigmentación normal y no envejecida.

65 En una exposición alternativa adicional, la invención proporciona una composición cosmética o farmacéutica como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección o trastorno de la piel de un animal en donde dicha piel está anormalmente seca, la capa córnea de la piel está anormalmente engrosada o la piel tiene un trastorno de la pigmentación.

Se ha descubierto que las composiciones de la invención son particularmente útiles para reducir el tamaño de los poros cutáneos. A este respecto, aparece acné en parte cuando hay una acumulación de células cutáneas muertas en los poros (hiperqueratinización del canal sebáceo). Se ha descubierto que las composiciones de la invención ayudan a normalizar el desprendimiento de las células cutáneas dentro de los poros y evitar la obstrucción que, junto con aceite y bacterias, puede producir lesiones cutáneas, por ejemplo lesiones inflamadas, tales como pápulas y pústulas y lesiones no inflamadas, tales como espinillas negras y espinillas blancas. Por lo tanto, las composiciones definidas en el presente documento pueden usarse en un método cosmético para reducir el tamaño de los poros cutáneos.

Visto de manera alternativa, las composiciones de la invención pueden ser para su uso en un método cosmético o no cosmético para tratar o prevenir el acné, por ejemplo lesiones cutáneas inflamadas y/o no inflamadas, tales como pápulas, pústulas, espinillas negras y/o espinillas blancas.

En un aspecto preferido, los usos médicos y cosméticos se consiguen mediante la administración tópica a la piel.

Por tanto, en un aspecto particularmente preferido, las composiciones cosméticas o farmacéuticas definidas en el presente documento son para su uso en el tratamiento de trastornos en los que la piel está anormalmente seca, la capa córnea de la piel está anormalmente engrosada o en los que está presente un defecto de la pigmentación, por ejemplo, callos, helomas, verrugas, eccema, dermatitis de contacto, psoriasis, ictiosis, acné y manchas cutáneas.

En un aspecto adicional particularmente preferido, las composiciones cosméticas o farmacéuticas definidas en el presente documento son para su uso en el tratamiento de trastornos en los que la piel está anormalmente seca.

Como se usa en el presente documento, el "tratamiento" se refiere a la reducción, alivio o eliminación, preferentemente hasta niveles normales, de uno o más de los síntomas o efectos de dicha afección o trastorno, por ejemplo la presencia o alcance de sequedad o engrosamiento de la piel, alcance o área de pigmentación, prurito o dolor, etc. en relación con los síntomas o efectos presentes en una parte diferente del cuerpo de dicho individuo donde la piel no padece dicha afección o trastorno y no se somete a dicho tratamiento o en un individuo normal correspondiente no sometido a dicho tratamiento.

La "prevención" se refiere a la prevención absoluta, o reducción o alivio del alcance o momento (por ejemplo retardo) de la aparición de ese síntoma o efecto. Por ejemplo, las afecciones tipificadas por sequedad, engrosamiento o pigmentación anómala de la piel pueden prevenirse mediante la aplicación regular de composiciones de la invención antes de la aparición de dicha afección.

El método de tratamiento o prevención según la invención puede combinarse provechosamente con la administración de uno o más principios activos que son eficaces en el tratamiento o la prevención de los trastornos o afecciones y/o para conseguir hidratación o exfoliación. Por tanto, las composiciones cosméticas o farmacéuticas de la invención pueden contener adicionalmente uno o más de dichos principios activos.

Según un aspecto adicional más de la invención se proporcionan composiciones cosméticas o farmacéuticas como se definen en el presente documento y opcionalmente uno o más principios activos adicionales como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia humana o animal, preferentemente como se describe en el presente documento.

Las composiciones de la invención se pueden formular de una manera convencional con uno o más vehículos, excipientes y/o diluyentes fisiológicamente aceptables, según técnicas bien conocidas en este campo usando ingredientes fácilmente disponibles.

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

Por tanto, las composiciones se pueden incorporar, opcionalmente junto con otras sustancias activas como una preparación combinada, con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes convencionales, para producir preparaciones galénicas convencionales tales como comprimidos, píldoras, polvos, grageas, sobrecitos, obleas, elixires, suspensiones (en forma de líquidos de inyección o infusión), emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en forma de un sólido o en un medio líquido), pomadas, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles y similares. También pueden usarse polímeros biodegradables (tales como poliésteres, polianhídridos, ácidos poliláctico o ácido poliglicólico) para implantes sólidos. Las composiciones pueden estabilizarse mediante el uso de liofilización, subenfriamiento o Permazyme. Dichas composiciones forman composiciones de la invención (es decir, se preparan de acuerdo con la etapa (h)).

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

10 Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes que aumentan la viscosidad, agentes de granulación, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes osmóticoactivos, agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, potenciadores de la adsorción (por ejemplo agentes de penetración en superficie), por ejemplo sales biliares, lecitinas, tensioactivos, ácidos grasos, quelantes), agentes de oscurecimiento, disolvente orgánico, antioxidante, agentes estabilizantes, emolientes, silicona, alfa-hidroxiácido, demulcentes, agentes antiespumantes, agentes hidratantes, vitamina, aroma, espesantes iónicos o no iónicos, tensioactivos, carga, espesante iónico o no iónico, secuestrante, polímero, propulsor, agente alcalinizante o acidificante, opacificante, agentes colorantes y compuestos grasos y similares. Algunos de estos componentes se describen con más detalle a continuación.

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

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

30 La composición de la invención puede estar provista de enzimas, incluyendo, pero sin limitación, una cualquiera o más de, enzimas frutales (por ejemplo bromelaina), superóxido dismutasa, peroxidasa, hialuronidasa y mucopolisacaridasa.

Los péptidos pueden seleccionarse de, pero sin limitación, una cualquiera o más de D,L-carnosina, D-carnosina, L-carnosina, anserina y Matrixyl (derivado pentapeptídico).

35 Los aminoácidos pueden seleccionarse entre, pero sin limitación, una cualquiera 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-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina y derivados de los mismos incluyendo aminoácidos de origen no natural como se define en la Tabla 1.

40

TABLA 1

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
ácido α-aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
α-amino-α-metilbutirato	Mgabu	L-N-metilarginina	Nmarg
aminociclopropano-carboxilato	Cpro	L-N-metilasparagina	Nmasn
		ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-metilcisteína	Nmcys
aminonorbornil-carboxilato	Norb	L-N-metilglutamina	Nmgln
		ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
ciclohexilalanina		Chexa L-N-metilhistidina	Nmhis
ciclopentilalanina	Cpen	L-N-metilisoleucina	Nmile
D-alanina	Dal	L-N-metilleucina	Nmleu
D-arginina	Darg	L-N-metillisina	Nmlys
ácido D-aspártico	Dasp	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-cisteína	Dcys	L-N-metilnorleucina	Nmnle
D-glutamina	Dgln	L-N-metilnorvalina	Nmnva
ácido D-glutámico	Dglu	L-N-metilornitina	Nmorn
D-histidina	Dhis	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-isoleucina	Dile	L-N-metilprolina	Nmpro
D-leucina	Dleu	L-N-metilserina	Nmser
D-lisina	Dlys	L-N-metiltreonina	Nmthr

(continuación)

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
D-metionina	Dmet	L-N-metiltriptófano	Nmtrp
D-ornitina	Dorn	L-N-metiltirosina	Nmtyr
D-fenilalanina	Dphe	L-N-metilvalina	Nmval
D-prolina	Dpro	L-N-metiletilglicina	Nmetg
D-serina	Dser	L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
D-treonina	Dthr	L-norleucina	Nle
D-triptófano	Dtrp	L-norvalina	Nva
D-tirosina	Dtyr	α-metil-aminoisobutirato	Maib
D-valina	Dval	α-metil-γ-aminobutirato	Mgab
D-α-metilalanina	Dmala	α-metilciclohexilalanina	Mchexa
D-α-metilarginina	Dmarg	α-metilciclopentilalanina	Mcpen
D-α-metilasparagina	Dmasn	α-metil-α-naftilalanina	Manap
D-α-metilaspartato	Dmasp	α-metilpenicilamina	Mpen
D-α-metilcisteína	Dmcys	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
D-α-metilglutamina	Dmgln	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
D-α-metilhistidina	Dmhis	N-(3-aminopropil)glicina	Norn
D-α-metilisoleucina	Dmile	N-amino-α-metilbutirato	Nmaabu
D-α-metilleucina	Dmleu	α-naftilalanina	Anap
D-α-metillisina	Dmlys	N-bencilglicina	Nphe
D-α-metilmetionina	Dmmet	N-(2-carbamiletil)glicina	Ngln
D-α-metilornitina	Dmorn	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
D-α-metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D-α-metilprolina	Dmpro	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D-α-metilserina	Dmser	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D-α-metiltreonina	Dmthr	N-cicloheptilglicina	Nchep
D-α-metiltriptófano	Dmtrp	N-ciclohexilglicina	Nchex
D-α-metiltirosina	Dmty	N-ciclododecilglicina	Ncdec
D-α-metilvalina	Dmval	N-ciclododecilglicina	Ncdod
D-N-metilalanina	Dnmala	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D-N-metilarginina	Dnmarg	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D-N-metilasparagina	Dnmasn	N-cicoundecilglicina	Ncund
D-N-metilaspartato	Dnmasp	N-(2,2-difeniletil)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-hidroxietil)glicina	Nthr
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxietil)glicina	Nser
D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(imidazoliletal)glicina	Nhis
D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(3-indoliletal)glicina	Nhtrp
D-N-metillisina	Dnmlys	N-metil-γ-aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmet
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	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metiltriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletal)glicina	Nval
D-N-metiltirosina	Dnmtyr	N-metila-naftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
ácido γ-aminobutírico	Gabu	N-(p-hidroxifenil)glicina	Nhtyr

(continuación)			
Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasaragina	Masn
L- α -metilaspártato	Masp	L- α -metil- <i>f</i> -butilglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
L- α -metilglutamina	Mgln	L- α -metilglutamato	Mglu
L- α -metilhistidina	Mhis	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
L- α -metilleucina	Mleu	L- α -metillisina	Mlys
L- α -metilmetionina	Mmet	L- α -metilnorleucina	Mnle
L- α -metilnorvalina	Mnva	L- α -metilornitina	Morn
L- α -metilfenilalanina	Mphe	L- α -metilprolina	Mpro
L- α -metilserina	Mser	L- α -metiltreonina	Mthr
L- α -metiltriptófano	Mtrp	L- α -metiltirosina	Mtyr
L- α -metilvalina	Mval	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhph
N-(N-(2,2-difeniletíl)carbamilmetil)glicina	Nnbhm	N-(N-(3,3-difenilpropil)carbamilmetil)glicina	Nnbhe
1-carboxi-1-(2,2-difeniletílamino) ciclopropano	Nmbc	L-O-metil serina	Omser
		L-O-metil homoserina	Omhser

Los aminoácidos particularmente preferidos como antioxidantes pueden seleccionarse de uno cualquiera o más de glicina, lisina, arginina, cisteína, cistina, histidina, tirosina y triptófano.

5 La composición de la invención puede comprender uno o más lípidos que incluyen grasas, aceites, ceras y similares. Son aceites polares adecuados, por ejemplo, los del grupo de lecitinas y triglicéridos de ácidos grasos, a saber, 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 pueden, por ejemplo, elegirse provechosamente 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 macadamia y similares.

15 Como alternativa o de modo adicional, el aceite puede seleccionarse 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 muestra una presión de vapor de no más de 0,2 mm Hg a 25 °C y una presión atmosférica; (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.

20 Los aceites no volátiles pueden seleccionarse 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.

25 Los ejemplos de aceites de hidrocarburos no volátiles incluyen ésteres ramificados de diglicerina o triglicerina o los ésteres o 1,2,3,4 butano triol o eritritol, di eritritol o tri eritritol. Preferentemente, los aceites de hidrocarburos no volátiles comprenden hexanoato de eritritol trietilo (disponible como Salacos E-38 de Nisshin Oilio) y triisoestearato de Poliglicerilo-2 (disponible como Cosmol 43V de Nisshin Oilio), carbonato de dietil hexilo (disponible como Tegosoft DEC de Degussa), éter dicaprílico (disponible como Cetiol OE de Cognis AG), carbonato de dicaprilo (disponible como Cetiol CC de Cognis AG), isononanoato de isononilo (disponible como Lanol 99 de Seppic), neopentanoato de tridecilo (disponible como Ceraphyl 55 de International Speciality Products), o una mezcla de los mismos.

35 Los aceites volátiles pueden seleccionarse entre aceites de silicona volátiles, tanto funcionalizados como no funcionalizados, aceites de hidrocarburos volátiles y mezclas de los mismos. Un aceite volátil útil en la presente invención puede ser saturado o insaturado, tener una cadena sencilla o ramificada o una estructura cíclica o tener una cualquiera o más de estas características.

Los ejemplos de aceites de hidrocarburos volátiles incluyen polidecanos tales como isododecano e isodecano (por

ejemplo, Permethy-99A que está disponible de Presperse Inc.) y las isoparafinas C7-C15 (tales como la serie Isopar disponible de Exxon Chemicals).

5 El aceite de silicona volátil puede seleccionarse 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.; líquidos de silicona SF-1204 y SF-1202 de Momentive Performance Materials; GE 7207 y 7158 de General Electric Co.); y, SWS-03314 de SWS Silicones Corp.

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

15 La composición de la invención puede comprender adicionalmente uno o más polisacáridos seleccionados de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de polisacáridos aniónicos (por ejemplo ácido algínico, pectina, goma de xantano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, goma arábica, goma karaya, goma de tragacanto, carboximetilquitina, goma de celulosa, glucosaminoglucanos), polisacáridos catiónicos (por ejemplo quitosano, quitosano acetilado, goma guar catiónica, hidroxietilcelulosa catiónica (HEC)), polisacáridos no iónicos (por ejemplo almidón, dextrinas, goma guar, éteres de celulosa tales como hidroxietilcelulosa, metilcelulosa y nitrocelulosa), polisacáridos anfotéricos (por ejemplo carboximetilquitosano, N-hidroxi-dicarboxietil-quitosano, almidón de patata modificado) y polisacáridos hidrófobos (por ejemplo hidroxietilcelulosa cetílica, polyquaternium24).

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

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

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

45 En algunas realizaciones el protector 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.

50 Pueden encontrarse ejemplos adecuados de protectores solares derivados cinámicos en el CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7ª edición, volumen 2, págs.1672, editado por Wenning y Mc Ewen (The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C. 1997). El derivado cinámico puede seleccionarse 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.

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

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

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

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

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

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

15 Las vitaminas pueden seleccionarse de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de vitamina A y sus derivados (por ejemplo retinoide o retinol o sus derivados tales como palmitato de retinilo o propionato de retinilo), biotina, ácido fólico, pantotenato de calcio, nicotinamida, HCl de piridoxina, HCl de piridoxal, riboflavina, HCl de tiamina, 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 ascorbilo Mg, acetato de ascorbilo), tocoferoles y derivados (por ejemplo, acetato de vitamina E).

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

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

Los tioles pueden seleccionarse de, pero sin limitación, uno cualquiera o más de aurotioglucosa, propiltiouracilo, tioredoxina, ácido lipoico, glutatión, cisteína, cistina, cistamina y su glicosilo, N-acetilo, metilo, etilo, propilo, amilo, butilo y laurilo, palmitoilo, oleilo, γ -linoleilo, colesterilo y ésteres de glicerilo y las sales de los mismos, tioldipropionato de dilaurilo, tioldipropionato de diestearilo, ácido tioldipropiónico y derivados de los mismos.

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

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

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

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

55 Puede incorporarse una diversidad de principios activos opcionales adicionales en las composiciones 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 amino guanidina); compuestos de hexaminidina, sales o derivados de los mismos; aminas de azúcares; agentes autobronceadores (por ejemplo deshidroxiacetona); agentes estructuradores; agentes gelificantes hidrófilos; medicamentos antiacné (resorcinol, ácido salicílico, y similares); agentes suavizantes y cicatrizantes cutáneos tales como alantoína y similares; y agentes adecuados para fines estéticos tales como aceites esenciales, fragancias, agentes sensoriales cutáneos, opacificantes, compuestos aromáticos (por ejemplo, aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto y eugenol). Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse para proporcionar liberación rápida, sostenida o retardada de los principios activos después de la administración al cuerpo empleando técnicas bien conocidas en este campo.

65

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

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

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

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

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

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

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

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por vía tópica a la piel mediante un producto, dispositivo o material en que la composición se ha aplicado, impregnado o unido químicamente. Con este fin, vendajes, tiritas (por ejemplo parches adhesivos), gasa, esparadrappo, hisopos de algodón u otros materiales absorbentes, por ejemplo una borla, tejido o esponja, o matrices de soporte pueden recubrirse, impregnarse o unirse químicamente con una composición como se describe en el presente documento. Por ejemplo, Muchas composiciones pueden aplicarse a la piel usando parches dérmicos que están bien descritos en la técnica, por ejemplo, documentos US 2008/0038300, US 2009/0043236, WO 2005/067499 y WO 2009/085302. En algunas realizaciones, el material que comprende la composición como se describe en el presente documento puede estar en forma de un dispositivo que puede ser, por ejemplo, llevado por el sujeto para tratar. Por ejemplo, la composición como se describe en el presente documento puede aplicarse, impregnar o unirse químicamente con un material o matriz de soporte que forma todo o parte de un pañal, guante, calcetín, etc.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención comprende el suministro de un producto, material o dispositivo que está recubierto, impregnado o unido químicamente con una composición como se describe en el presente documento. Dichos productos, materiales o dispositivos pueden usarse como se describe en el presente documento. Preferentemente dicho producto es una venda, tirita (por ejemplo parche adhesivo), gasa, esparadrappo o hisopo de algodón o dicho dispositivo es un pañal, guante o calcetín.

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

Las composiciones pueden proporcionarse en una forma adaptada para administración oral o parenteral. Las formas farmacéuticas alternativas incluyen por tanto comprimidos sencillos o recubiertos, cápsulas, suspensiones y soluciones que contienen el componente activo opcionalmente junto con uno o más vehículos convencionales inertes y/o diluyentes, por ejemplo con almidón de maíz, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, ácido cítrico, ácido tartárico, agua, agua/etanol, agua/glicerol, agua/sorbitol, agua/polietilenglicol, propilenglicol, alcohol estearílico, carboximetilcelulosa o sustancias grasas tales como grasa dura o mezclas adecuadas de los mismos.

La concentración de los principios activos en composiciones descritas en el presente 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 transcurso del tratamiento, la edad y el peso del paciente, la indicación cosmética o terapéutica, el cuerpo o área corporal para tratar y puede variarse o ajustarse según la elección. En general, sin embargo, la composición preparada según el método de la invención después de la etapa de filtración (g) se diluye en la etapa (h) hasta 0,001, 0,005, 0,01 o de 0,1 a 50 %, por ejemplo 0,005-40 %, por ejemplo de 0,1 a 25 %, tal como 0,1 o de 0,5 a 5, por ejemplo 1-5 % (p/p o v/v) para proporcionar la preparación final para administración, en particular para administración tópica, por ejemplo una solución de 1 % o 3 % de la composición después de la etapa (g).

Cuando se añaden componentes adicionales a la composición realizada por el método descrito anteriormente, por ejemplo agentes hidratantes adicionales como se describe en el presente documento, el componente adicional puede estar presente en las cantidades 0,0001, 0,0005, 0,001 o de 0,01 a 50 %, por ejemplo 0,0005-40 %, por ejemplo de 0,01 a 25 %, tal como 0,1 o de 0,5 a 5, por ejemplo 1-5 % (p/p de la preparación final para administración, en particular para administración tópica). Las dosis individuales eficaces para la composición pueden encontrarse en el intervalo de 0,0001-100 mg/cm²/día (proteína total en la composición), por ejemplo 0,1-100 mg/cm²/día, preferentemente 0,0001-10 mg/cm²/día, por ejemplo 0,1-10 mg/cm²/día, cuando se aplica por vía tópica, dependiendo del animal mamífero que se trata, tomada como una única dosis.

La administración puede ser mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica médica, incluyendo, por ejemplo, administración oral, intestinal, percutánea, bucal, rectal o tópica o administración por inhalación. Las formas de administración preferidas se administrarán por vía oral o, más preferentemente, por vía tópica. Como se apreciará, la administración oral tiene sus limitaciones si el principio activo es digerible. Para solucionar dichos problemas, los ingredientes pueden estabilizarse como se ha mencionado previamente.

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

Los animales a los que pueden aplicarse o administrarse las composiciones están limitados a mamíferos. Preferentemente los mamíferos son primates, animales domésticos, ganado y animales de laboratorio. Por tanto los animales mamíferos preferidos incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas, gatos, perros, monos, cerdos, vacas, cabras, ovejas y caballos. De forma especialmente preferente, las composiciones se aplican, o se administran, a seres humanos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente como ilustración en la que las figuras a las que se hace referencia son las siguientes:

La Figura 1 muestra diagramas de barras que representan (A) la reducción media y (B) la reducción relativa del diámetro de los poros cutáneos en comparación con piel sin tratar después de 4 semanas de un tratamiento dos veces al día con un gel (Gel B) que comprende 1 % de la composición de líquido de incubación preparada en la etapa (g) en el método de la invención.

La Figura 2 muestra diagramas de barras que representan (A) la reducción media y (B) la reducción relativa del número de lesiones cutáneas inflamadas en comparación con piel sin tratar después de 4 semanas de un tratamiento dos veces al día con un gel (Gel B) que comprende 1 % de la composición de líquido de incubación preparada en la etapa (g) en el método de la invención.

La Figura 3 muestra diagramas de barras que representan (A) la reducción media y (B) la reducción relativa del número de lesiones cutáneas no inflamadas en comparación con piel sin tratar después de 4 semanas de un tratamiento dos veces al día con un gel (Gel B) que comprende 1 % de la composición de líquido de incubación preparada en la etapa (g) en el método de la invención.

La Figura 4 muestra un diagrama de barras que representa (A) la comparación del efecto exfoliante de un gel (gel activo) que comprende 3 % de la composición de líquido de incubación preparada en la etapa (g) en el método de la invención y una solución al 3 % de ácido glicólico usando un ensayo de D-Squame. Una puntuación menor indica menos descamación, es decir mayor exfoliación. (B) muestra una fotografía del área de ensayo tratada con el gel activo en t₀ y después de 5 minutos.

La Figura 5 muestra diagramas de barras que representan (A) el aumento medio y (B) el aumento relativo de la hidratación cutánea en comparación con piel sin tratar después de 3 semanas de un tratamiento dos veces al día con un gel (Gel B) que comprende 3 % de la composición de líquido de incubación preparada en la etapa (g) en el método de la invención.

La Figura 6 muestra diagramas de barras que representan (A) la evaluación visual media y (B) la evaluación visual relativa de la gravedad del eccema o acné en comparación con piel sin tratar después de 3 semanas de un tratamiento dos veces al día con un Gel que comprende 3 % de la composición de líquido de incubación preparada en la etapa (g) en el método de la invención.

La Figura 7 muestra diagramas de barras que representan (A) la reducción media y (B) la reducción relativa del número de lesiones cutáneas inflamadas y no inflamadas en comparación con piel sin tratar después de 3 semanas de un tratamiento dos veces al día con un gel que comprende 3 % de la composición de incubación preparada en la etapa (g) en el método de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de la composición

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

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

15 El líquido de incubación procesado se cargó en una columna de intercambio iónico de dietilaminoetilo (DEAE) según las instrucciones del fabricante y se lavó con una solución de Tris HCl 20 mM (pH 8,50). El flujo continuo se descartó. Se eluyeron proteínas de leucolectina de la columna con la solución de lavado que contenía NaCl 50 mM. El eluido se recogió para otros usos. Los polipéptidos de interés (es decir metaloproteinasas, serina proteasa y polipéptidos de cáscara de huevo) se eluyeron de la columna con la solución de lavado que contenía NaCl 1 M. El eluido se recogió y después se diafiltró con un tamaño de exclusión de filtro de 8 kDa para intercambiar el agua del líquido de incubación por tampón. En este caso, el tampón fue solución salina tamponada con fosfato, aunque otros tampones son igualmente adecuados. Por ejemplo, un tampón que contiene fosfato 0,5 mM y NaCl 1 mM o tampones que contienen Tris milimolar (por ejemplo 10 mM) a pH cercano a la neutralidad o ligeramente alcalino (pH 7,5 - 8,5), que contienen NaCl 5 mM, son adecuados. El retenido de la etapa de diafiltración se recogió y se diluyó mediante la adición del tampón.

20 Por último, el filtrado se sometió a filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 μm y se recogió el filtrado final. Este filtrado es una preparación muy enriquecida de la metaloproteinasas, serina proteasa y polipéptidos de cáscara de huevo y partes de polipéptidos hallados en el líquido de incubación en bruto, que no comprende o comprende solo cantidades traza de polipéptidos de leucolectina del líquido de incubación.

Ejemplo 2: Efectos *in vivo* de la composición sobre el tamaño de poro cutáneo

35 La composición de líquido de incubación se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 1. La composición se preparó como un gel al 1 % [v/v] (volumen total de composición por unidad de volumen de gel) y se comparó con un gel de control que no comprendía el componente activo, es decir la composición de líquido de incubación (Gel B en la Figura 1). El gel comprendía un conservante (0,8 %), diglicerina (3,00 %) y goma de xantano (0,8 %), en agua.

40 Se realizó un ensayo clínico controlado por placebo, con doble ocultación, en 23 voluntarias. Las 23 voluntarias tenían edades entre 22,4 y 58,7 años (39,3 \pm 13,6 años).

45 El ensayo usó un diseño hemifacial. Los sitios de aplicación fueron la mitad derecha o izquierda de la cara. El gel activo se asignó a los sitios de ensayo de manera aleatoria (derecha/izquierda). El análisis del tamaño de los poros se realizó en poros en el área de la mejilla encima del pliegue nasolabial.

50 El gel activo fue aplicado dos veces al día por las voluntarias en casa durante un periodo de 4 semanas. El gel se aplicó en una cantidad de práctica habitual a la mitad de la cara, dejando la otra mitad sin tratar (asignación de manera aleatoria).

55 Para visualizar el tamaño de los poros, se aplicó una crema que contenía óxido de cinc (Penaten®) al área de medición de modo que la crema se incorporara a los poros. El exceso se retiró cuidadosamente con un pañuelo de papel. Se tomaron microimágenes mediante una cámara digital Canon PowerShot G9 usando el accesorio D-scope II (objetivo con aumento 40x) y se grabó mediante el software FotoFinder® 2007 mediscoppe. El D-Scope tiene un anillo reflector prismático y luces LED integradas, lo que garantiza una iluminación equilibrada del área de visualización. Se tomó una imagen por cada sitio de ensayo. Después de completarse el estudio, se usó el software ImageJ para medir el tamaño (diámetro) de tres poros seleccionados por cada sitio de ensayo. Se midieron los mismos poros en t0 y t1.

60 Se tomaron imágenes para el análisis del tamaño de los poros antes de comenzar la primera aplicación del gel (t0) y después de 4 semanas de tratamiento (t1). Todas las evaluaciones se realizaron en una habitación con clima controlado a 21,5 °C (\pm 1 °C) y 50 % (\pm 5 %) de humedad relativa. La evaluación en el punto temporal t1 se realizó 10-20 horas después del último tratamiento con el producto.

65 Para evaluación de las diferencias entre los sitios de ensayo en t0, se analizaron los datos originales. Para evaluación

de las diferencias entre los sitios de ensayo después del tratamiento (t1), se analizaron los datos en relación con t0 y la situación sin tratamiento. Los datos relativos dobles (datos relativos a t0 y la situación sin tratamiento) se calcularon de la siguiente manera: (situación de tratamiento en t1/situación de tratamiento en t0)/(situación sin tratamiento en t1/situación sin tratamiento en t0). Estos datos reflejan el cambio en los parámetros teniendo en cuenta las alteraciones de la situación sin tratamiento (control) y diferencias entre los sitios de ensayo antes de someterse a diferentes tratamientos (incluyendo el sitio de ensayo de control).

Resultados

La situación t0 fue homogénea. El sitio de ensayo que iba a tratarse con el gel activo después de la evaluación de t0 no difirió significativamente en el tamaño de los poros del sitio de ensayo que iba a dejarse sin tratar ($p=0,3811$). En t0, el tamaño de los poros fue en promedio $0,60 (\pm 0,19)$ mm para el sitio de ensayo sin tratamiento y $0,65 (\pm 0,22)$ mm para el sitio de ensayo tratado con gel activo.

El tamaño de los poros del sitio de ensayo sin tratamiento fue homogéneo en el periodo de estudio ($p=0,5084$). Con respecto a los datos relativos a t0 y t1 sin tratamiento, la piel tratada con el gel activo (es decir que comprende 1 % de la composición de líquido de incubación de la etapa (g)) mostró una reducción estadísticamente significativa del tamaño de los poros de aproximadamente 22 % en comparación con la situación sin tratamiento después de cuatro semanas de tratamiento diario ($p=0,0005$) (Figura 1). No se registró ninguna reacción cutánea adversa.

Ejemplo 3: Efectos *in vivo* de la composición sobre las lesiones cutáneas (acné)

Se preparó un gel que comprendía la composición de líquido de incubación de la etapa (g) como se ha descrito en el Ejemplo 2 (Gel B en la Figura 2).

Se realizó un ensayo clínico controlado por placebo, con doble ocultación, en 21 voluntarias aptas. Las voluntarias tuvieron edades entre 18,2 y 34,5 años ($26,3 \pm 5,0$ años). Las voluntarias eran aptas para participar en el estudio por tener puntos en su frente, mejillas y/o barbilla.

El ensayo usó un diseño hemifacial. Los sitios de aplicación fueron la mitad derecha o izquierda de la cara, incluyendo frente, mejillas y barbilla. El gel activo se asignó a los sitios de ensayo de manera aleatoria (derecha/izquierda).

El gel activo fue aplicado dos veces al día por las voluntarias en casa durante un periodo de 4 semanas. El producto se aplicó en una cantidad de práctica habitual a la mitad de la cara, dejando la otra mitad sin tratar (asignación de manera aleatoria).

El número de lesiones inflamadas (pápulas, pústulas) y no inflamadas (espinillas negras, espinillas blancas) se contó visualmente en ambos sitios de ensayo antes de comenzar la primera aplicación del gel (t0) y después de 4 semanas de tratamiento (t1). Todas las evaluaciones se realizaron en una habitación con clima controlado a $21,5 \text{ °C} (\pm 1 \text{ °C})$ y 50 % ($\pm 5 \%$) de humedad relativa. La evaluación en el punto temporal t1 se realizó 10-20 horas después del último tratamiento con el producto.

El recuento de lesiones fue realizado por el mismo evaluador en ambas evaluaciones para cualquier sujeto dado. Todos los recuentos de lesiones se realizaron en condiciones de iluminación convencionales. Se realizaron recuentos en la frente, mejillas y barbilla (pero no el área de la nariz) para cada una de las espinillas negras (comedones abiertos), espinillas blancas (comedones cerrados), pápulas y pústulas.

Resultados

Recuentos de lesiones inflamadas

La situación t0 no fue homogénea. El sitio de ensayo que iba a tratarse con el gel activo después de la evaluación basal difirió significativamente en el número de lesiones inflamadas del sitio de ensayo que iba a dejarse sin tratar ($p=0,0217$). En t0, el número de lesiones inflamadas fue en promedio $8,4 (\pm 7,4)$ para el sitio de ensayo sin tratamiento y $7,0 (\pm 6,5)$ para el sitio de ensayo tratado con gel activo. El número de lesiones inflamadas del sitio de ensayo sin tratamiento fue homogéneo en el periodo de estudio ($p=0,0815$).

La piel tratada con el gel activo mostró una reducción estadísticamente significativa del número de lesiones inflamadas en comparación con la situación sin tratamiento después de cuatro semanas de tratamiento diario ($p=0,0086$) (Figura 2). No se registró ninguna reacción cutánea adversa.

Recuentos de lesiones no inflamadas

La situación t0 fue homogénea. El sitio de ensayo que iba a tratarse con el gel activo después de la evaluación basal no difirió significativamente en el número de lesiones no inflamadas del sitio de ensayo que iba a dejarse sin tratar ($p=0,8753$). En t0, el número de lesiones no inflamadas fue en promedio $3,2 (\pm 5,3)$ para el sitio de ensayo sin

tratamiento y 2,8 (\pm 3,2) para el sitio de ensayo tratado con Gel B. El número de lesiones no inflamadas del sitio de ensayo sin tratamiento fue homogéneo en el periodo de estudio ($p=0,9057$).

5 La piel tratada con gel activo mostró una reducción estadísticamente significativa del número de lesiones no inflamadas en comparación con la situación sin tratamiento después de cuatro semanas de tratamiento diario ($p=0,0215$) (Figura 3). No se registró ninguna reacción cutánea adversa.

Ejemplo 4: Efectos *in vivo* de la composición en la exfoliación

10 Se preparó un gel que comprendía 3 % de la composición de líquido de incubación de la etapa (g) como se ha descrito en el Ejemplo 2.

15 Se realizó un ensayo clínico controlado por placebo, con doble ocultación, en 3 mujeres con signos visibles de sequedad y descamación de la piel en ambas pantorrillas. Las 3 mujeres tenían edades entre 38,4 y 57,8 años (en promedio 48,1 \pm 9,7 años).

20 El estudio se usó para analizar el efecto del gel que comprende la composición la composición de líquido de incubación en la exfoliación en comparación con ácido glicólico (3 %). Hubo 8 áreas de ensayo en las pantorrillas, es decir 4 en cada pantorrilla para tratamiento con el gel activo o ácido glicólico. La asignación del tratamiento con producto a las áreas de ensayo se permutó. Entre los cuatro sitios de ensayo se dejó uno sin tratar mientras que los otros tres se trataron con producto durante 5 min, 10 min o 15 min.

25 Inmediatamente antes del tratamiento con producto de ensayo (t_0), se tomó una muestra de D-Squame® de cada pantorrilla (en el área solapante de los cuatro sitios de ensayos). El gel activo y el ácido glicólico (3 %) fueron aplicados una vez por un técnico sobre el sitio de ensayo respectivo en las pantorrillas. Se permitió que los productos actuaran sobre la piel durante 5 min, 10 min y 15 min, con un ensayo sin tratamiento ("0 min"). Después, los 4 sitios de ensayo se aclararon con agua y se permitió que se secaran al aire antes de tomarse una muestra de D- Squame® de los 4 sitios de ensayo. Todos los discos de D-Squame® se transfirieron a las tarjetas de almacenamiento negras y se evaluaron visualmente con respecto al grado de descamación usando la siguiente puntuación:

- 30 Puntuación 0: ausente
 Puntuación 1: ligero
 Puntuación 2: moderado
 Puntuación 3: grave
 35 Puntuación 4: extremo

No hubo ninguna reacción adversa de incomodidad.

Resultados

40 La evaluación de exfoliación en 3 sujetos usando D-Squames® reveló una mayor reducción de la descamación en promedio para el gel activo en comparación con el ácido glicólico después de regímenes de tratamiento de 5 min, 10 min o 15 min (Figura 4).

45 Ejemplo 5: Efectos *in vivo* de la composición sobre la hidratación cutánea

Se preparó un gel que comprendía 3 % de la composición de líquido de incubación de la etapa (g) como se ha descrito en el Ejemplo 2.

50 Se realizó un ensayo clínico controlado por placebo, con doble ocultación, en 4 sujetos. Los sujetos eran aptos para participar en el estudio por tener sequedad de la piel en los antebrazos. Los 4 sujetos tenían edades entre 56,3 y 70,9 años (en promedio 64,3 \pm 6,3 años).

55 Los sitios de ensayo para analizar la hidratación cutánea fueron ambos antebrazos. Hubo cuatro áreas de ensayo en los antebrazos, a saber, dos en cada parte interior del antebrazo. Se trataron dos áreas con el gel activo que comprendía la composición de líquido de incubación, una se trató con glicerina (control) y la cuarta se dejó sin tratar.

60 Los tratamientos fueron realizados dos veces al día por los sujetos en casa durante un periodo de tres semanas. Los productos se aplicaron en una cantidad de 2 mg/cm² al sitio de ensayo del antebrazo correspondiente (de forma aleatoria, con un sitio de ensayo sin tratar y otro tratado con glicerina como control).

Antes de comenzar la primera aplicación del producto (t_0) y después de tres semanas de tratamiento (t_1) se midió la hidratación cutánea en el antebrazo (Corneometer CM825®, 10 mediciones repetidas).

65 Todas las mediciones se realizaron en una habitación con clima controlado 21,5 °C (\pm 1 °C) y 50 % (\pm 5 %) de humedad relativa después de que los sujetos se hubieran adaptado con sus áreas de ensayo descubiertas a estas

condiciones climáticas interiores durante al menos 30 min. Las mediciones y tratamientos en el punto temporal t1 se realizaron 10-20 horas después del último tratamiento con el producto.

Resultados

5 La piel tratada con el gel activo (gel B) que comprende 3 % v/v de la composición de líquido de incubación de la etapa (g) mostró un aumento medio de la hidratación cutánea en 4 sujetos de aproximadamente 21 % en comparación con la situación sin tratamiento después de 3 semanas de un tratamiento con el producto dos veces al día (Figura 5).

10 Ejemplo 6: Efectos *in vivo* de la composición sobre eccema y acné

Se preparó un gel que comprendía 3 % de la composición de líquido de incubación de la etapa (g) como se ha descrito en el Ejemplo 2.

15 Se realizó un ensayo clínico controlado por placebo, con doble ocultación, en 4 sujetos, 2 para eccema y 2 para acné. Los sujetos eran aptos para participar en el estudio por tener eccema o acné (evaluado visualmente por un experto). El efecto del gel activo sobre el grado de eccema o acné se analizó en el área problemática seleccionada, es decir en la mano o el brazo (eccema) o la cara (acné).

20 El gel activo fue aplicado dos veces al día por la mañana y por la tarde por los sujetos en casa durante un periodo de tres semanas, usando una cantidad de producto que corresponde a la práctica real.

25 Inmediatamente antes de comenzar la primera aplicación de producto (t0) y después de tres semanas de tratamiento (t1), el grado de eccema o acné fue evaluado visualmente mediante puntuación de vida dermatológica objetiva y evaluación subjetiva por los sujetos en sí mismos. Los recuentos de lesiones (número y calidad de lesiones no inflamadas (espinillas blancas y espinillas negras) e inflamadas (pápulas y pústulas) se evaluaron dermatológicamente (solamente para los 2 sujetos con acné facial)).

30 La evaluación visual por el experto y la evaluación subjetiva se realizaron según la siguiente puntuación:

- Puntuación 0: ausente
- Puntuación 1: ligero
- Puntuación 2: moderado
- Puntuación 3: grave
- 35 Puntuación 4: extremo

40 La evaluación visual por el experto así como la evaluación subjetiva (datos no mostrados) mostraron una reducción del grado de eccema y acné en promedio en 2 sujetos después de un régimen de tratamiento de 3 semanas con el gel activo (Figura 6). El recuento de lesiones reveló una reducción del número de lesiones inflamadas y no inflamadas de media en 2 sujetos después de un régimen de tratamiento de 3 semanas con el gel activo (Figura 7).

Secuencias:

SEQ ID NO: 1: Metaloproteinasa - salmón atlántico

MDHRPTLSLL LLLLLLGLSQ ASGNEFHDEP DHVSITSVIL KSNNGTNELL LDGDILAPRT
 RNAMKCFSSQ YSCLWKKSSD GLVYVPYILS AVYSSLEVET IETAMKYFQG KTCIRFIPRK
 TQTAYLDIQS SGGCFGTVGT VGDRQTLSLA QFGCVQHGI QHELLHALGF HEHNRSDRE
 QYIRINWQYI YDYAVGNFQK EDTNNLHTAY DYSSVMHYDR TAYTNDYGKE TITPIPDPSV
 45 AIGQRLGMSD IDVLKVNKLY QC

SEQ ID NO: 2: Fragmento de polipéptido de cáscara de huevo I - salmón atlántico

TVTQCTKDG QFVVVSRDA TLPNLELDSI SLLGANGAHC TPVGTTSFA IYQFKVTECG
 TVVTEEPDTI VYENRMSSSY VVGIGPFGDI TRDSHYDLVF QCRYTGTSVE TLVIEVK

50 SEQ ID NO: 3: Fragmento de polipéptido de cáscara de huevo II - salmón

AVTVQCTKDG QFVVVVARDA TLPSLELDSI SLLGTNGPHC HAIGTTSVFA IYQFKVTECG
TVMTEETDI IYENRMSSSY QVGVGPFSGI TRDSQYDLTF QCRYKGSTIV AVVIDVKPVP
PPNPDIAPGP LTVELRLGSG TCLTKGCNEE EVAYTSYYTE ADYPVTKVLR DPVYTEVRIL
ARTDPNIVLT LGRCWATTNP NPLSLPQWDL LIDGCPYQDD RYLTTIPINVG PSSGLSFPTH
YRRFVLKMFT FVDPMSMTPL R

SEQ ID NO: 4: Fragmento de polipéptido de cáscara de huevo III - salmón

AECRENMVHV EAKHDLLGIG QLIQLEDLTL GDCPMSGFDN INQVLIFESP
LQSCGSQLRM TTNSLIYIFT LYYKPKPLAN TPLIRTNDAM INIECHYPRK HNVSSLALIP
TWTPFSAKY AEELLYFSMR LMTADWQYER AGNMYVLGDM VNIEASVMQY

FHVPLRIFVD SCVATLEPNI NANPRYAFIE NHGCLIDAKM TGSHSQFMPR SADYKLYFQV
EAFR

5

SEQ ID NO: 5: Proteína zr de longitud completa - salmón atlántico

MKWSAVCLVA VATLGWLCDA QNFLEKPGWP PIQTPPSWPP QTPQRPVQPL
PQRPAQPFLQ KPAQPIQRI PYTEDDTKQT CEVVDKDKVS CGLSGITAAQ
CQAISCCFDG RMCIFYGKTVT VQCTKDGQFV VVSRDATLP NLELDSISLL
GANGAHCTPV GTTSAFAIQ FKVTECGTVV TEEPDTIVYE NRMSSSYVVG IGPFGDITRD
SHYDLVFQCR YTGTSVETLV IEVKTYPNPN PVVTDAVLN VELRLANGRC
LSKGCDEMQE AYTSYYTVAD YPVTKVLRDP VYAEVRILGM TDPNVVLTLE
QCWATIDPTG DRLPRWDLV NGCPYQDDRY LTVPIASDSS YIPPGFLSH
YKRFVFKMFT FVDPTSMVPL QENVYIHCRV TVCHALAGSC EQRCNRQRRD
LSAQGQKTK GDVVVSSQKV IMIDPSLYA

10

SEQ ID NO: 6: Coriogenina H de longitud completa - salmón del Pacífico

MKWSAVCLVA VATLGWLCDA QIYLEKPGWP PIQTPASWPA QPPEKPVQPP
QRPAQPPQWP AQPPQWPAQP PQRPAQPPQR PAQTQQWPGQ PPQRPAQPPQ
WPAQPPQRPA QPPQRPAQPP QRPAQPPPRP AQPPQWPVHP PQWPVQPGT
LQRPKFSPDP GSKQSCDVDS QHKVQCGLPD ITAAHCDAIN CCFDGRMCFY
GKAVTVQCTK DGQFVVVVAR DATLPSLELD SISLLGTNGP HCHAIGTTSV FAIQFKVTE
CGTVMTEETD TIIYENRMSS SYQVGVGPFSGI SITRDSQYDLTFQCRYKGST IVAVVIDVKP
VPPNPDIAP GPLTVELRLG SGTCLTKGCN EEEVAYTSYY TEADYPVTKV
LRDPVYTEVR ILARTDPNIV LTLGRCWATT NPNPLSLPQW DLLIDGCPYQ DDRYLTTIPIN
VGPSSGLSFP THYRRFVLKM FTFVDPMSMT PLRETVFIHC NTAVCLPSHG
DSCEPRCYRK RRDIPAAVQK TTRIKSNLVS SGELILTDPR ELTN

SEQ ID NO: 7: Coriogenina L de longitud completa - salmón del Pacífico

ES 2 721 179 T3

MAMKWSVVCL VAVAMLGCLC VAQIWPPSIK PVQQPFRPNR PPPQQPQQPP
YQKPRIPPKD QTQAKQKFET PLDWTYPLDP KPEPKIIGGS EARTPVAANS
VRAECRENMV HVEAKHDLLG IGQLIQLEDL TLGDCPMSGF DNINQVLIFE SPLQSCGSQ
RMTTNSLIYI FTLYYKPKPL ANTPLIRTND AMINIECHYP RKHNVSSLAL IPTWTPFSAA
KYAEELLYFS MRLMTADWQY ERAGNMYVLG DMVNIEASVM QYFHVPLRIF
VDSCVATLEP NINANPRYAF IENHGCLIDA KMTGSHSQFM PRSADYKLYF
QVEAFRFQSQ RGS DPIIPQK TKIPFQPAAD YPATLDMIFL TCHLKATTIA FPIDFEYKAC
SFINTWREAG GNDGVCGCCD STCSNRKGRD TTHQKPANI WEGDVQLGPI FISEKVEQ

SEQ ID NO: 8: Proteína zr alternativa - salmón atlántico

KWSYQLPQKL AQPLPQKPAQ PLPQWPVQPL PQRPAEPLPQ RPAQPLPQWP
VQPLPQRPAE PLPQRPAQPL PQRPVQPLPQ RPAQPFLQKP AQPIPQRIPY
TKDDTKQTCE VVDKDKVSCG LSGITAAQCQ AISCCFDGRM CFYGKTVTFQ
CTKDGQFVVV VSRDATLPNL ELDSISLLGA NGAHCTPVG TSAFEIYQFK VTECGTVVTE
EPDTIVYENR MSSSYVVGIG PFGDITRDSH YDLVFQCRYT GTSVETLVIE VKTYPNPNPV
VTVDAVLNVE LRLANGRCLS KGCDEMQUEAY TSYYTVADYP VTKVLRDPVY
AEVRILGMTD PNVVLTLEQC WATTDPTGDR LPRWDLVNG CPYQDDRYLT
VPIASDSSYI PPGEFLSHYK RFVFKMFTFV DPTSMVPLQE NVYIHCRATV CHALAGSCEQ
RCNRQRDLS AQGQKTKGD VVSSQKVIM IDPSLYA

5

SEQ ID NO: 9: polipéptido de leucolectina de embrión de salmón:

MRTTAAFLVLCLLAISHAWDCQEVVNIKNLMQIDAGLGQVVATDTSQIPYYLVGDKWIRLP
GSLKHITVGPAGIWGVNKDYAIYKYVAGNWWQAAGLLKQLDAGGEQFIVGANMNDTPYCLT
SSATVG YKGP GSPLPWTGLPGAVKY YSCGPF GCVAVNKNDDIYLM SLNQCQNKGWSHI
EGKLSMIEVATDGSVFGVNSAGSVYTRDGITASKPEGTGWSNIPMGMLMGHVTYDLGRLW
VSKSAVTMVCTH

SEQ ID NO: 10: polipéptido de leucolectina de leucocitos de salmón:

SIPYYLVGDKWIRLP GSLKHITVGPAGIWGVNKDYAIYKYVAGNWWQAAGLPKQLDAGGEQ
FIVGANMDDTPYCLTSSATVG YKGP GSPLPWTGLPGAVKY YSCGPF GCVAVNKNDDIYLM
SLNQCQNNGW SHIEGKLSMIEVATDGSVFGVNSAGSVYTRDGITASKPEGTGWSNIPMC
MLMGHVTYDLGRLWVSKSAVTMVCTH

10

SEQ ID NO: 11: polipéptido de leucolectina-2 de salmón:

MRTTAAFLVLCLLAISHAWDCQEVVNIKNLMQIDAGLGQVVATDTSQIPYYLVGDKWIRLP
GSLKHITVGPAGIWGVNKDYAIYKYVAGNWWQAAGLLKQLDAGGNQFVVGANMDDTPFCL
TSSATVG YKGP GSPLPWTGLPGAVKY YSCGHFGCVAVNKNDDIFLMSLNQCQNNGWS
HIDGKLSMIEVATDGSVFGVNSAGSVYTRDGITASKPEGTGWSNIPMGMLMGHVTYDLGRL
WVSKSGGTMVCTH

15

ES 2 721 179 T3

SEQ ID NO: 12: polipéptido de leucolectina-3 de salmón:

MGTTAAFLLVLCLLAISHAWDCQEVVNIKNLMQIDAGLGQVWATDTSQIPYYLVGDKWIRLP
GSLKHITVGPAGIWGVNKDYAIYKYVAGNWWQAAGLLKQLDAGGEQFIVGANMNDTPYCLT

SSATVGYKGP GSPLPWTGLPGAVKYYSCGPFGCWAVNKNDDIYLSLNQDCQNKGWSHI
EGKLSMIEVATDGSVFGVNSAGSVYTRDGITASKPEGTGWSNIPMGMLMGHVTYDLGRLW
VVYKSAVTMVCTH

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición farmacéutica o cosmética de líquido de incubación de pescado que comprende al menos las etapas de:

- a) suspender huevos de pescado en un volumen mínimo de agua;
- b) inducir eclosión rápida, sincronizada, de dichos huevos, preferentemente de modo 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 líquido de incubación; y
- d) filtrar el líquido de incubación usando un filtro con un tamaño de poro de al menos 5 μm y recoger el filtrado; e) someter el filtrado de la etapa (d) a cromatografía de intercambio iónico que comprende:

- (1) cargar el filtrado en una columna de intercambio iónico de DEAE (dietilaminoetilo);
- (2) lavar la columna con una solución de lavado tamponada a un pH de 7-9;
- (3) eluir los polipéptidos de leucolectina de la columna usando un primer tampón de elución que comprende la solución de lavado tamponada que comprende además una sal a una concentración de 50-100 mM;
- (4) eluir los polipéptidos restantes de la columna usando un segundo tampón de elución que comprende la solución de lavado tamponada que comprende una sal a una concentración de 500 mM a 2 M;
- (5) recoger el eluido de la etapa (4);

- f) cambiar el agua en el eluido de la etapa (5) con un tampón farmacéutica o cosméticamente aceptable realizando diafiltración usando un filtro con un tamaño de exclusión de menos de 12 kDa;
- g) filtrar la solución obtenida de la etapa (f) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,15-0,30 μm y recoger el filtrado; y
- h) preparar dicha composición farmacéutica o cosmética del filtrado de la etapa (g).

2. El método de la reivindicación 1, que comprende una etapa adicional de filtrar el filtrado de la etapa (d) usando un filtro con un tamaño de poro de 0,30-0,60 μm y recoger el filtrado.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde:

- a) el tamaño de poro del filtro en la etapa (d) es de 5-15 μm , en donde preferentemente el tamaño de poro es de 7 μm ;
- b) el tamaño de poro del filtro en la reivindicación 2 es de 0,35-0,55 μm , en donde preferentemente el tamaño de poro es de 0,45 μm ; y/o
- c) el tamaño de poro del filtro en la etapa (g) es de 0,22 μm .

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde 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*, *Stenopterygii*, *Cyclosquamata*, *Scopelomorpha*, *Lampridiomorpha*, *Polymixiomorpha*, *Paracanthopterygii* y *Acanthopterygii*.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el pez es de cualquier orden seleccionado de la lista que consiste en *Osteoglossiformes*, *Hiodontiformes*, *Elopiiformes*, *Albuliformes*, *Notacanthiformes*, *Anguilliformes*, *Saccopharyngiformes*, *Clupeiformes*, *Gonorynchiformes*, *Cypriniformes*, *Characiformes*, *Gymnotiformes*, *Siluriformes*, *Argentiniiformes*, *Salmoniformes*, *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*.

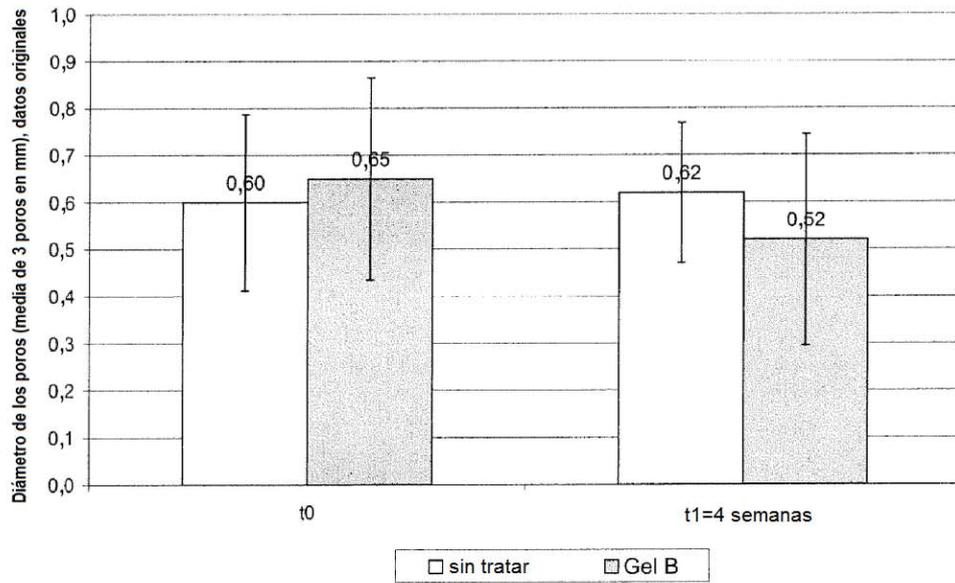
6. El método de la reivindicación 5, en donde el pez es de cualquier familia seleccionada de la lista que consiste en *Salmonidae*, *Cyprinidae*, *Cichlidae*, *Pangasiidae*, *Sciaenidae*, *Serranidae*, *Carangidae*, *Sparidae*, *Lateolabracidae*, *Moronidae*, *Mugilidae*, *Latidae*, *Eleotridae* y *Acipenseridae*.

7. El método de la reivindicación 6, en donde 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*), carpín (*Carassius carassius*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus niloticus*), *Pangasius pangasius*, rohu (*Labeo rohita*), salmón atlántico (*Salmo salar*), corvina japonesa (*Larimichthys crocea*), mero lutra (*Epinephelus tauvina*), trucha marina (*Salmo trutta trutta*), pez limón del Japón (*Seriola quinqueradiata*), dorada (*Sparus aurata*), serrano japonés (*Lateolabrax japonicus*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Chrysophrys auratus*), mágil (*Mugil cephalus*), perca gigante (*Lates calcarifer*), gobio de mármol (*Oxyeleotris marmorata*), tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), trucha asalmonada (*Oncorhynchus mykiss*), salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*), salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*), salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*), salmón chum (*Oncorhynchus keta*), salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), esturión siberiano (*Acipenser baerii*) y esturión del Danubio (*Acipenser gueldenstaedtii*).

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la eclosión se completa en menos de 2 horas para más del 95 % de los embriones.
- 5 9. Una composición farmacéutica o cosmética obtenida o que puede obtenerse del método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en terapia.
- 10 11. Un método cosmético de:
- (i) exfoliar y/o hidratar la piel de un animal; y/o
 - (ii) reducir el tamaño de los poros cutáneos en un animal; o
 - (iii) tratar o prevenir una afección o trastorno de la piel de un animal en donde dicha piel está anormalmente seca, la capa córnea de la piel está anormalmente engrosada o la piel tiene un trastorno de la pigmentación,
- 15 en donde una composición como se define en la reivindicación 9 se administra a dicho animal.
12. Una composición como se define en la reivindicación 9 para su uso en:
- (i) exfoliación y/o hidratación de la piel de un animal; o
 - (ii) tratamiento o prevención de una afección o trastorno de la piel de un animal en donde dicha piel está anormalmente seca, la capa córnea de la piel está anormalmente engrosada o la piel tiene un trastorno de la pigmentación.
- 20
- 25 13. Un método o composición de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde la afección o trastorno cutáneo para tratar o prevenir es:
- (i) eccema, dermatitis de contacto, psoriasis, ictiosis o acné;
 - (ii) lesiones cutáneas inflamadas y/o no inflamadas, preferentemente pápulas, pústulas, espinillas negras y/o espinillas blancas; o
 - (iii) callos, helomas, verrugas o manchas cutáneas.
- 30
14. Un método o composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde dicha composición recubre, impregna o se une químicamente con un producto, material o dispositivo.
- 35 15. Un producto, material o dispositivo que está recubierto, impregnado o unido químicamente con una composición como se define en la reivindicación 9.

Figura 1

A



B

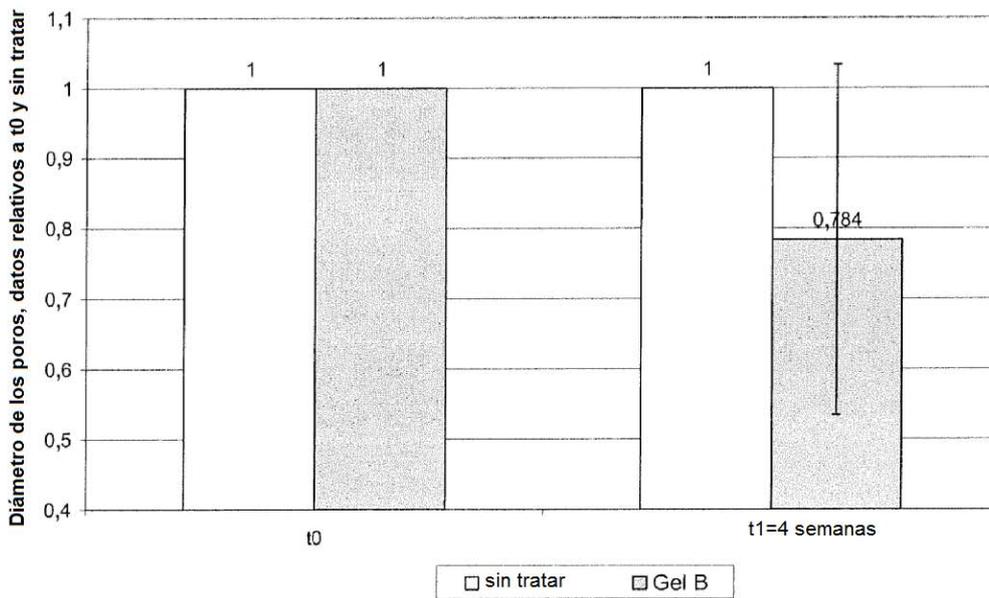


Figura 2

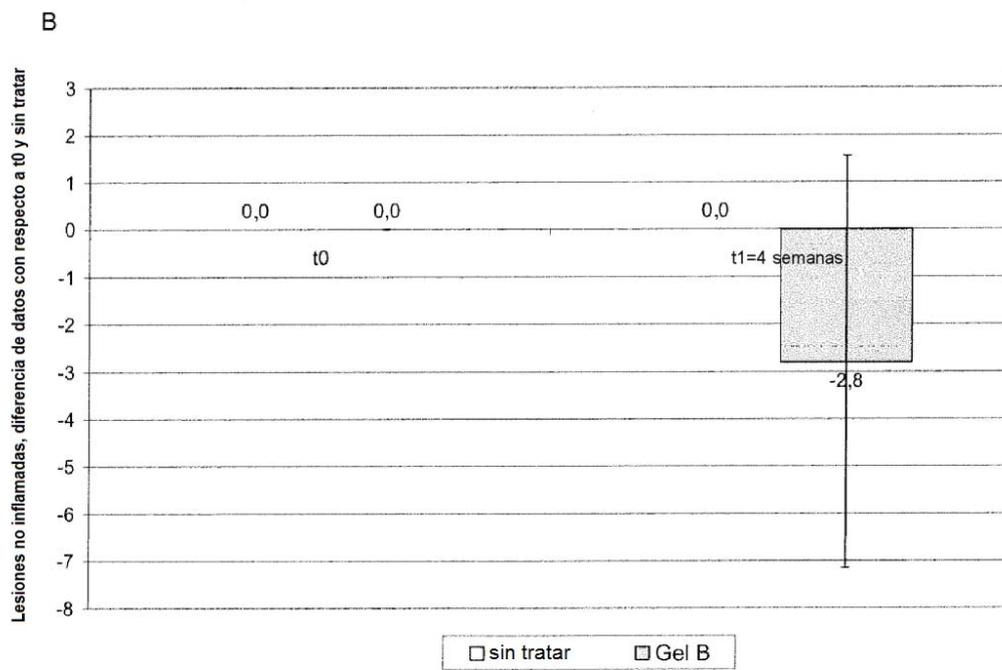
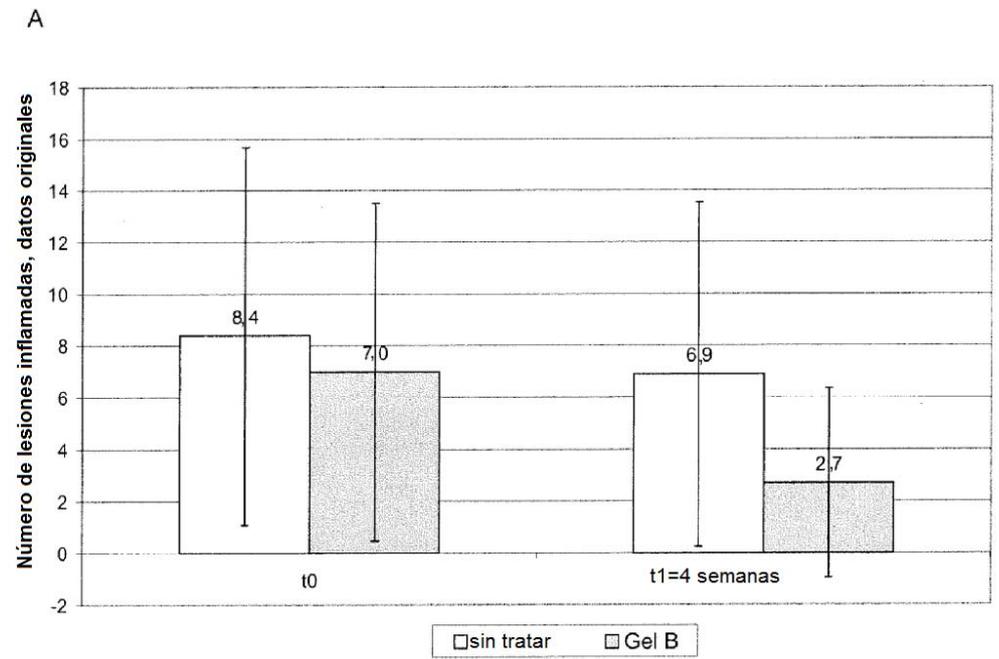


Figura 3

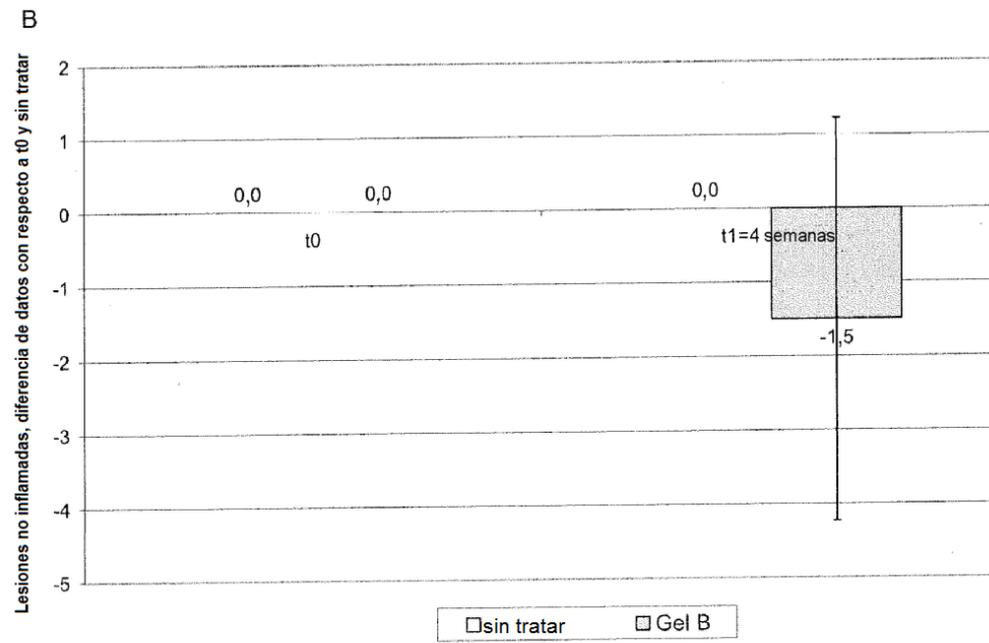
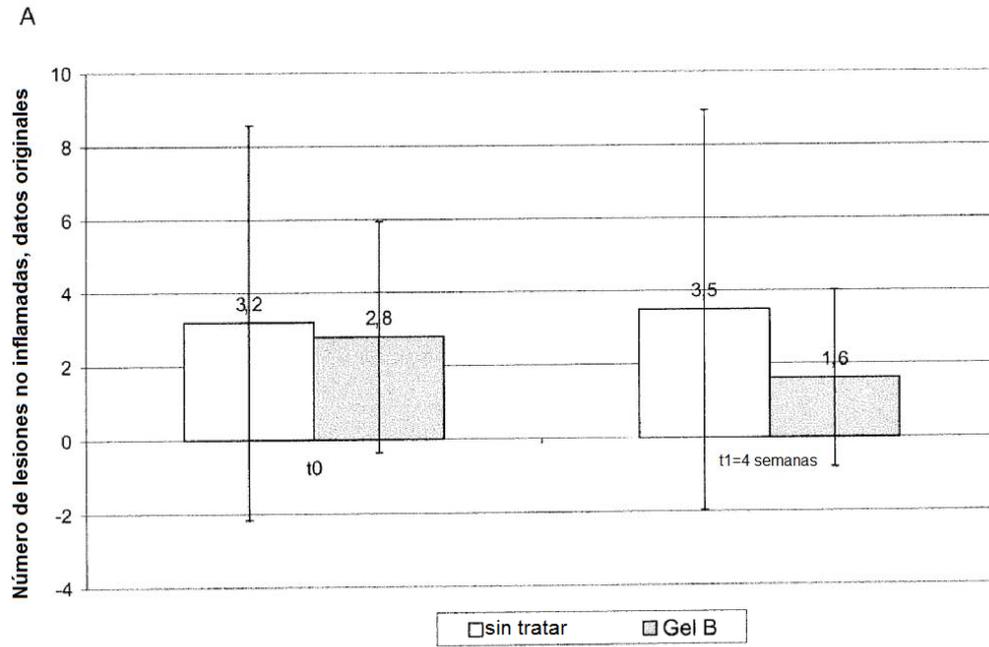
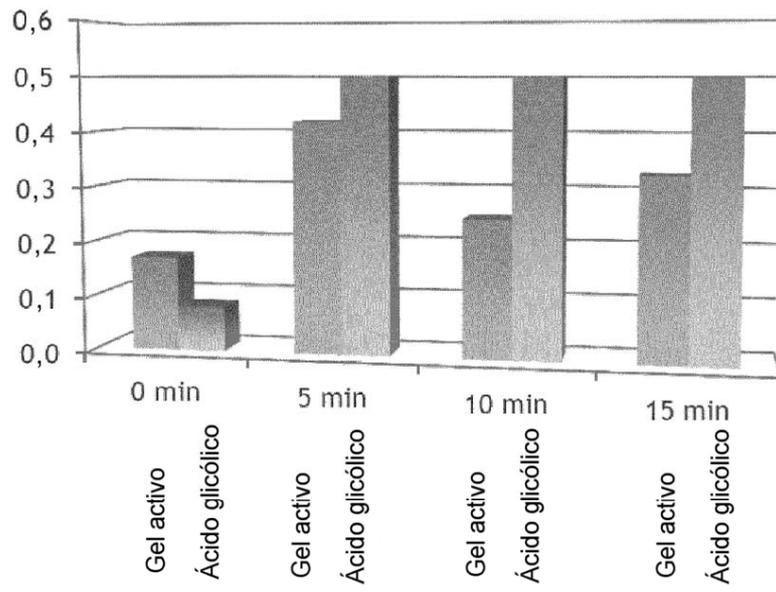


Figura 4

A



B

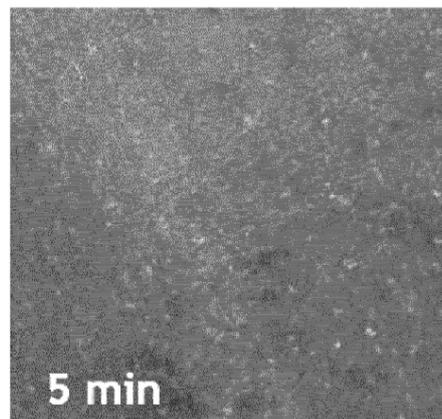
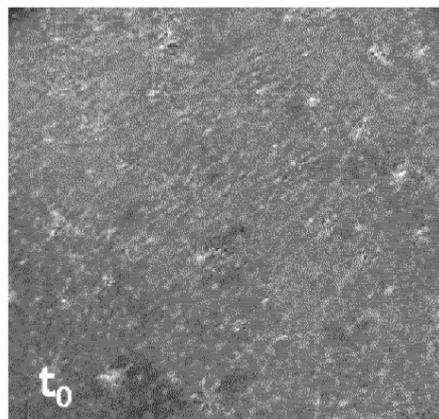


Figura 5

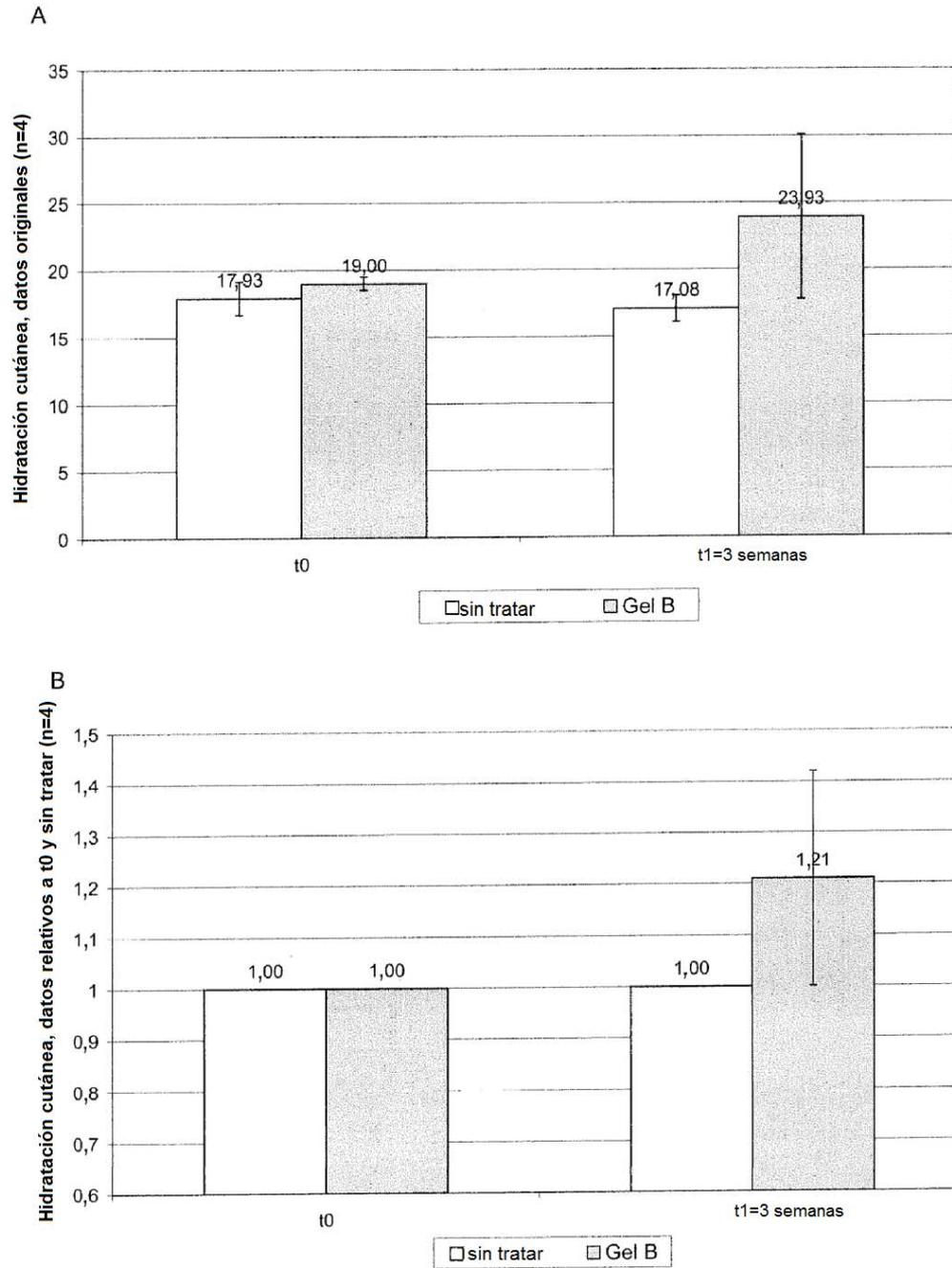


Figura 6

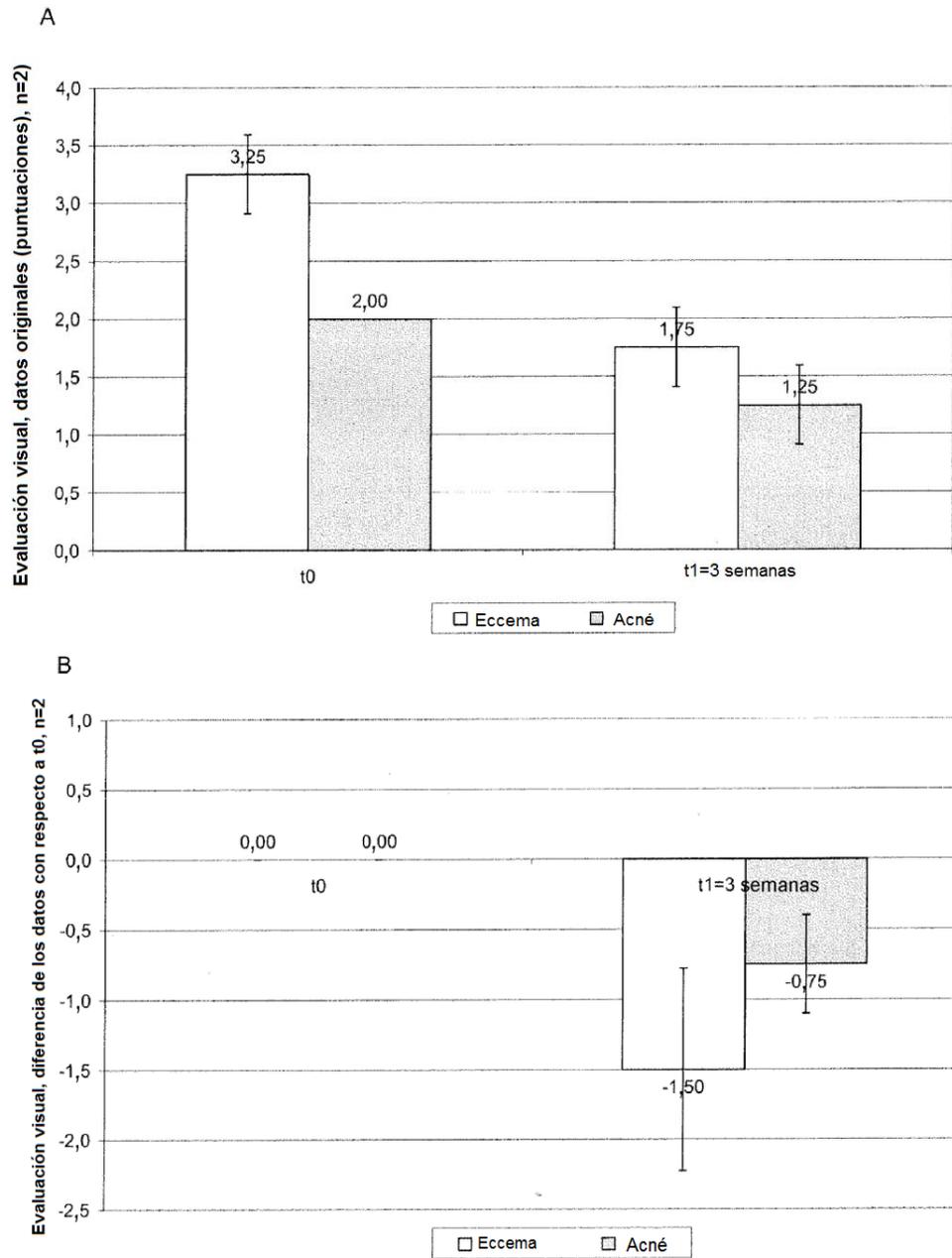


Figura 7

