



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 836**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

A61Q 19/04 (2006.01)

A61Q 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07787699 .3**

96 Fecha de presentación : **18.07.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2049074**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **Uso no terapéutico de un hidrolizado de proteínas de arroz como principio activo pigmentante.**

30 Prioridad: **18.07.2006 FR 06 06780**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2010

73 Titular/es: **Laboratoires Expanscience**
10, avenue de l'Arche
92400 Courbevoie, FR

72 Inventor/es: **Msika, Philippe y**
Naaïmi, Dalale

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 347 836 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

Uso no terapéutico de un hidrolizado de proteínas de arroz como principio activo pigmentante.

5 La presente invención se refiere al uso no terapéutico de por lo menos un hidrolizado de proteínas de arroz como principio activo pigmentante, en una composición cosmética, o nutracéutica.

10 La melanina es un pigmento que, en el ser humano, es responsable del color de la piel, del cabello y de los ojos. La melanina es producida por los melanocitos, células que se encuentran en la epidermis, a partir de un aminoácido: la tirosina. La tirosinasa transforma la tirosina en DOPA y después en DOPA-quinona. Numerosas enzimas intervienen después para formar la melanina.

15 En el melanocito, la melanina se encuentra en los organelos intracelulares (los melanosomas). Estos melanosomas son transferidos por los melanocitos gracias a sus ramificaciones (dendritas) hacia los queratinocitos cercanos. El melanosoma asegura su función protectora con respecto a los UV colocándose encima del núcleo del queratinocito de manera parecida a una sombrilla.

20 Los melanocitos se sitúan a nivel de la unión dermo-epidérmica y se insertan entre los queratinocitos de la capa basal. Un melanocito protege 36 queratinocitos, es lo que se denomina unidad melánica.

25 En el ser humano, la melanina es responsable de la pigmentación constitutiva y del bronceado. Por medio del bronceado, protege al ADN de las células de la piel de los rayos ultravioleta (UV) del Sol, UVA y UVB. Durante una exposición prolongada al Sol, el cuerpo se broncea debido a que fabrica más melanina, protegiéndolo así mejor de la radiación ultravioleta. La melanina actúa absorbiendo las radiaciones ultravioletas restituyendo en forma de calor la energía recibida. La definición de los fototipos humanos integra el concepto de color inicial de la piel y la capacidad de broncearse y enrojecerse en el Sol. Existe por lo tanto un interés para un fototipo dado para acceder a un fototipo superior que le dará mayor fotoprotección por medio de un índice más alto de pigmentación.

30 Debido a una sobreexposición al Sol y/o a antecedentes familiares genéticos, o a una enfermedad de la piel, pueden aparecer manchas blancas poco estéticas, que consisten en una pérdida de la pigmentación de la piel. La afección de la piel más común de este tipo es el vitiligo.

35 También pueden aparecer manchas blancas en la piel (principalmente en los pacientes bronceados) en el caso de *Pityriasis versicolor*, una afección debida a la proliferación excesiva de un hongo que pertenece al grupo de levaduras del género *Malassezia*. En la actualidad, se sabe cómo tratar estas levaduras. Sin embargo, el tratamiento detiene la infección pero las manchas blancas persisten, normalmente hasta la siguiente exposición al Sol. Asimismo, pueden aparecer unas hipocromías después de cicatrices postraumáticas o después de quemaduras, durante la formación de estrías antiguas (estrías blancas no inflamatorias) y por último después del tratamiento de herpes. Para acelerar la desaparición de estas manchas blancas, se puede aconsejar un tratamiento que favorezca la pigmentación.

40 La aparición del cabello blanco (canas) procede de la detención de la producción de melanina al nivel de su bulbo. No se conoce todavía muy bien el mecanismo de esta detención de producción. En cambio, se trata de un mecanismo hereditario y relacionado con la edad.

45 En la actualidad, se busca tener una piel bronceada pero limitando o eliminando las duraciones de exposición a los UV (naturales o no), y al mismo tiempo proteger la piel del envejecimiento cutáneo prematuro y otros efectos secundarios debidos a los UV.

50 El documento FR-A-2 553 285 se refiere a unas composiciones cosméticas colorantes para la coloración de soportes queratínicos tales como los cabellos, o bien destinadas a ser aplicadas sobre el revestimiento cutáneo. La sustancia activa es un derivado proteínico.

55 El documento US-A-5 662 890 describe unas composiciones cosméticas para el bronceado artificial de la piel. Las composiciones no comprenden alcohol ni aceite y se pueden aplicar en spray.

El documento EP-A-0 884 045 describe unas formulaciones que comprenden dihidroxiacetona para el bronceado de la piel. Estas composiciones tienen una estabilidad mejorada.

60 El documento WO 96/22698 describe unos hidrolizados de proteínas de arroz así como un procedimiento de obtención de estos hidrolizados.

El documento EP-A-1 656 970 describe unas composiciones cosméticas que comprenden unos hidrolizados de proteínas de arroz y un agente que aumenta la síntesis de los glicosaminoglicanos. Estas composiciones tienen un efecto anti-edad o anti-envejecimiento de la piel.

65 Ninguno de estos documentos describe la utilización de un hidrolizado de proteínas de arroz como agente activo para pigmentar, hiperpigmentar o repigmentar la piel y los faneros.

Los inventores han descubierto, de manera sorprendente e inesperada, que unos hidrolizados de proteína de arroz (denominados asimismo péptidos de arroz) tienen la propiedad de estimular la pigmentación cutánea. La aplicación del agente activo permite una mayor pigmentación constitutiva y un bronceado más rápido y más intenso durante una exposición más corta. Por consiguiente, se retarda la aparición de factores de envejecimiento cutáneo y otros efectos indeseables debidos a los UV.

La invención tiene por lo tanto como primer objeto el uso no terapéutico de un hidrolizado de proteína de arroz como principio activo pigmentante en una composición cosmética o nutracéutica para el ser humano y los animales.

Esta composición está destinada a estimular la pigmentación cutánea (que puede ser constitutiva o adquirida) y por lo tanto se puede usar como un acelerador de bronceado.

La composición se puede usar en cabinas de bronceado ya sea con una finalidad puramente estética (bronceado), o con una finalidad dermatológica (reforzar el fototipo de pacientes que tienen una piel clara y sensible al Sol).

De esta manera, según unas variantes ventajosas de la invención, la composición según la invención está destinada a aumentar e intensificar la pigmentación normal de la piel sin la luz solar. Está destinada asimismo a acelerar e intensificar el bronceado. Está destinada asimismo a prevenir el fotoenvejecimiento.

La invención tiene asimismo por objeto un método de tratamiento cosmético no terapéutico para estimular la pigmentación constitutiva o adquirida, caracterizado porque se aplica por vía tópica una composición que comprende por lo menos un hidrolizado de proteínas de arroz. Este método de tratamiento cosmético permite en particular acelerar el bronceado y el color natural de la piel sin la luz solar, o permite adquirir un bronceado con poca o ninguna luz solar.

Esta composición se puede usar asimismo para tratar las manchas de despigmentación (manchas blancas) sobre la piel, tales como el vitiligo o las hipopigmentaciones iatrogénicas (corticosteroides dérmicos). La composición se puede usar asimismo para repigmentar la piel de pacientes que hayan desarrollado pitiriasis, en particular *Pityriasis versicolor*. También podría permitir a las personas que sufren de xerodermia pigmentosa tener una estimulación de la pigmentación cutánea sin el Sol.

De esta manera, la invención tiene asimismo como objeto el uso no terapéutico de un hidrolizado de proteínas de arroz para repigmentar las manchas blancas cutáneas. Las manchas de despigmentación se pueden deber o ser consecuencia de una afección o una sensibilización seleccionada de entre el grupo constituido por vitiligo, pitiriasis (*Pityriasis versicolor*), el uso de corticosteroides dérmicos, cicatrización, o exposición intensa al Sol. Las manchas de despigmentación se pueden deber a un fotoenvejecimiento significativo.

La invención tiene asimismo como objeto el uso de un hidrolizado de proteínas de arroz para la fabricación de un producto para el cuidado capilar para la prevención y el tratamiento de las canas.

Dentro del alcance de la presente invención, las expresiones “hidrolizados de proteínas de arroz” y “péptidos de arroz” indican ambas el producto resultante de la hidrólisis enzimática de proteínas de arroz.

Los péptidos de arroz ya son conocidos en la técnica anterior y ya se han descrito procedimientos para obtener estos péptidos (EP 575452, WO 02/102347).

Están disponibles comercialmente unos hidrolizados de proteínas de arroz de la compañía SILAB, con la denominación Nutriskin. Estos hidrolizados comprenden unos péptidos de peso molecular bajo (inferior a 1400 Dalton). Se pueden obtener tal como se ha descrito en la solicitud internacional WO 02/102347.

Un procedimiento para preparar un hidrolizado de proteínas de arroz comprende, por ejemplo, las etapas que consisten en:

- solubilizar unas proteínas de arroz en agua para obtener una suspensión,
- hidrolizar esta suspensión en presencia de una o varias proteasas,
- ventajosamente, filtrar sobre una membrana para eliminar los compuestos insolubles, la enzima residual y los péptidos de peso molecular alto (superior a 10.000 Dalton);
- y eventualmente, realizar una filtración esterilizadora del concentrado obtenido previamente.

Las proteínas de arroz utilizadas se pueden obtener mediante trituración de los granos de arroz (por ejemplo *Oryza sativa*). También están disponibles comercialmente unos concentrados de proteínas de arroz (comercializados, por ejemplo, por la compañía REMY Industries).

Ventajosamente, el procedimiento para preparar el hidrolizado de proteínas de arroz no comprende ninguna etapa de fermentación o de germinación. Además, el arroz utilizado en la composición según la invención y/o utilizado en el procedimiento anterior, pertenece preferentemente al género *Oryza*, y más preferentemente de la especie *Oryza sativa* L. Ventajosamente, el hidrolizado de arroz utilizado en la composición según la invención, y el obtenido en el procedimiento de preparación anterior, resulta de una fracción de arroz libre de salvado de arroz.

El hidrolizado de proteínas de arroz utilizado en el procedimiento según la invención puede comprender unos péptidos que tienen una masa molecular media comprendida entre menos de 300 Dalton y más de 10.000 Dalton, preferentemente una masa molecular media comprendida entre 300 Dalton y 3.500 Dalton.

En particular, se utilizará preferentemente un hidrolizado de proteínas de arroz que comprende unos péptidos que tienen una masa molecular inferior o igual a 10.000 Dalton, preferentemente una masa molecular inferior o igual a 3.500 Dalton. Según un modo particular de la invención, por lo menos 75% en masa, ventajosamente por lo menos 80% en masa, muy ventajosamente por lo menos 85% en masa de los péptidos tienen una masa molecular comprendida entre 300 y 3.500 Da. En particular, por lo menos 50% en masa de los péptidos, ventajosamente por lo menos 55% en número de los péptidos, tienen una masa molecular comprendida entre 300 y 1200 Da.

La concentración de péptidos de arroz en la composición (cosmética, dermatológica o nutracéutica) utilizada según la invención está ventajosamente comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 20% en peso, más ventajosamente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10% en peso, más ventajosamente aún entre aproximadamente 4% y aproximadamente 6% en peso, con respecto al peso total de la composición.

La composición utilizada según la invención puede contener otros ingredientes activos que pigmentan o colorean la piel (además de la protección UV), conduciendo a un efecto complementario o sinérgico.

Se pueden citar en particular los siguientes ejemplos de agentes pigmentantes o colorantes:

- los agentes que colorean la piel: la dihidroxiacetona y las melaninas;
- los agentes que estimulan el proceso de pigmentación natural: los soralenos (8-metoxisoraleno, 5-metoxisoraleno, 4,5',8-trimetilsoraleno, o unos extractos vegetales de *Psoralea corylifolia* y de *Ammi majus*), los carotenoides (licopeno, cantaxantina), los agentes que estimulan la ruta de AMP cíclico (1. los análogos de AMPc tales como el 8-bromo-AMPc o dibutiril-AMPc, 2. la forskolina, 3. la isobutil-metil-xantina o la teofilina), los activadores de proteína quinasa C (diacilgliceroles, en particular oleoil-acetil-glicerol), dioles alifáticos o cíclicos (1,2-propanodiol, 5-norbornano-2,2-dimetanol, norbomano-2,2-dimetanol), los dioles bicíclicos de monoterpreno, los derivados de tirosina (L-tirosina, L-DOPA), el sulfóxido de dimetilo, los agentes lisomotrópicos, los dinucleótidos de timidina, los fragmentos de ADN, los análogos de la hormona estimuladora de melanocitos, la 3-isobutil-1-metilxantina, los donantes de ácido nítrico (David A. Brown, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 63 (2001) 148-161);
- los extractos vegetales, en particular las algas, que demuestran una actividad promelanogénica: *Laminaria digitata* (Thalitan de Codif).

La tirosinasa es una enzima implicada en la melanogénesis. De esta manera, los péptidos de arroz de la invención se pueden asociar con ingredientes activos capaces de:

- activar los factores que inducen la síntesis de tirosinasa;
- promover la actividad enzimática de tirosinasa;
- promover la glicosilación de tirosinasa (permitir su absorción por los melanosomas);
- aumentar la actividad general de los melanocitos;
- promover la transferencia de tirosinasa en los premelanosomas;
- favorecer los precursores de la melanina;
- restringir la actividad celular, que permite así conservar los queratinocitos cargados con melanina.

Los péptidos de arroz también se pueden asociar con unos agentes oxidantes o antioxidantes, produciendo un efecto complementario o sinérgico. Como ejemplos de agentes antioxidantes se pueden citar en particular la vitamina C, la vitamina E, los polifenoles (en particular los extraídos del té verde, uva o pino), y los derivados de azufre.

Los péptidos de arroz también se pueden asociar con unos agentes protectores celulares de la agresión solar, aparte de los agentes antioxidantes, que actúan sobre las células quemadas por el Sol, la p53, las proteínas de estrés (heat shock proteins), la apoptosis, la lisis de las membranas, la liberación de citoquina o de mediadores celulares.

Según otro aspecto de la invención, las composiciones utilizadas según la invención también contienen por lo menos un filtro o una pantalla UVB y/o UVA, tales como las pantallas o filtros minerales y/u orgánicos conocidos por el experto en la materia, que adaptarán sus elecciones y sus concentraciones en función del grado requerido de protección.

Las composiciones utilizadas según la invención pueden además contener unos agentes exfoliantes o unos agentes hidratantes, tales como los alfa-hidroxiácidos y salicílicos, y derivados de los mismos, por ejemplo en forma de éster.

Las composiciones utilizadas según la invención pueden contener asimismo unos agentes antiinflamatorios o calmantes, unos agentes que desensibilizan la piel, tales como AIN (agentes antiinflamatorios no esteroideos), unos corticoides dérmicos, unos agonistas de PPAR (peroxisome proliferator activated receptor: receptor activado por proliferador de peroxisomas), unos derivados de regaliz, de bisabolol, de isoflavonas (por ejemplo de soja), glicosilados o no, la palmitoiletanolamida, unos materiales insaponificables a base de fitosteroles y de vitamina E, unos anti-COX y/o LOX, (inhibidores de ciclo-oxigenasa y/o de lipoxidasa), aguas termales, marinas, o reconstituidas a partir de oligoelementos exógenos.

Por último, las composiciones utilizadas según la invención pueden contener asimismo unos agentes contra el envejecimiento: retinol, vitaminas B3, C y A, licopeno, carotenos, carotenoides, alfa-hidroxiácidos (AHA), beta-hidroxiácidos (BHA), libres, esterificados o injertados, unas proteínas de la matriz extracelular (glucosamina, sulfato de condroitina), colágeno, elastina y sus activadores, unos derivados furánicos de aguacate, fitosteroles, ácidos grasos insaturados y poliinsaturados, isoflavonas de plantas (soja, trébol), lactobacilos y otros prebióticos y probióticos.

Dentro del alcance del tratamiento o de la prevención de los cabellos blancos, la composición puede comprender además unos activadores del crecimiento del pelo y del cabello (minoxidil, aminexil, etc.) o unos agentes activos que inhiben o retardan la pérdida del cabello. Las composiciones pueden comprender asimismo unos agentes permanentes y colorantes del cabello, unos agentes filmógenos y fijadores, y unos tratamientos capilares del cabello.

La composición utilizada según la invención se puede administrar por vía tópica u oral.

En el ámbito de una aplicación tópica, la composición utilizada según la invención comprende un soporte dermatológico y/o cosméticamente aceptable, es decir, un soporte compatible con la piel. Ventajosamente, se puede presentar en todas las formas galénicas utilizadas normalmente para una aplicación tópica, en particular en forma de una disolución acuosa, hidroalcohólica u oleosa, una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, o múltiple, de un gel acuoso u oleoso, de un producto anhidro líquido, pasta o sólido, de una dispersión de aceite en una fase acuosa con la ayuda de esferoides (nanoesferas, nanocápsulas, vesículas lipídicas), de un dispositivo transdérmico, o en cualquier otra forma para aplicación tópica.

Esta composición puede ser más o menos fluida y puede tener el aspecto de una crema blanca o coloreada, de una pomada, de una leche, de una loción, de un suero, de una pasta, de una espuma, o de un gel. Opcionalmente se puede aplicar sobre la piel en forma de aerosol. Se puede presentar asimismo en forma sólida, por ejemplo en forma de barra. Se puede aplicar asimismo por medio de un parche.

En el ámbito de una administración oral, la composición se puede presentar en forma de una cápsula, de una cápsula blanda, de un comprimido, de un gránulo, de un spray o de una disolución bebible. Cuando la composición se presenta en forma de una cápsula blanda o una cápsula, la envoltura de dichas cápsulas blandas o cápsulas puede contener en particular una gelatina animal, tal como gelatina de pescado, glicerina, o un material de origen vegetal tal como un derivado de celulosa o de almidón, o una proteína vegetal. Cuando la composición se presenta en forma de una cápsula, de comprimido o de gránulo, los agentes activos se pueden fijar en un soporte pulverulento tal como sílice, celulosa y maltodextrina.

La composición utilizada según la invención puede contener asimismo los aditivos habituales en el campo de los cosméticos, tales como los estabilizadores, los conservantes, los antioxidantes, los disolventes, los perfumes, los agentes quelantes, los absorbentes de olor, los filtros químicos o minerales, los pigmentos minerales, los tensoactivos, los polímeros, los aceites de silicona y las materias colorantes o exfoliantes.

Los siguientes ejemplos tienen como objetivo evaluar los efectos de un agente activo a base de péptidos de arroz sobre la pigmentación y la fotoprotección cutánea.

Pigmentación: Evaluación multiparamétrica de los siguientes efectos:

- Efectos sobre la producción de melanina de melanocitos humanos normales co-cultivados con unos queratinocitos irradiados o no irradiados (NHEM-NHEK) (ejemplo 2).
- Efectos sobre la actividad de la tirosinasa en los cultivos de melanocitos (NHEM) (ejemplo 3).
- Efectos sobre la dendricidad de melanocitos co-cultivados con queratinocitos (NHEM-NHEK) (ejemplo 4).

ES 2 347 836 T3

- Efecto sobre la transferencia de melanosomas de los melanocitos a los queratinocitos cercanos (ejemplo 5).
- Efectos sobre la pigmentación de piel viva (ejemplo 6).

5 Fotoprotección: Efecto sobre la síntesis de glutatión (GSH) mediante unos fibroblastos cutáneos humanos irradiados con UVA (ejemplo 7).

Ejemplo 1

Péptidos de arroz según la invención

10 Los péptidos de arroz se obtienen mediante hidrólisis enzimática de proteínas de arroz. Las proteínas residuales se eliminan por ultrafiltración con un umbral de corte a 10.000 Da. Los péptidos se concentran por evaporación de agua al vacío o por nanofiltración (200 Da) hasta 5% de materia seca. La materia seca se puede obtener por evaporación en seco, por liofilización o por atomización.

Las características de los péptidos de arroz obtenidos se resumen en la tabla 1 siguiente:

TABLA 1

Características de los péptidos de arroz

Grado de hidrólisis	30% - 40%
% de materia seca (MS)	4-6% o >80% si se atomiza
pH	4-7
Contenido en proteínas / MS	80% - 95%
Contenido en nitrógeno alfa aminado / MS	15% - 25%
Contenido en aminoácidos libres	<4%
Contenido en aminoácidos azufrados	<3%
Repartición en masa molar	
	>3,500 Da: <2%
	3500 - 1200, Da: 20-35%
	1200 - 300 Da: 50-65%
	<300 Da: 5-15%

Después, estos péptidos de arroz se ensayan en los ejemplos 2 a 7 siguientes.

Ejemplo 2

Dosificación de la melanina producida por unos melanocitos humanos normales co-cultivados con unos queratinocitos irradiados o no irradiados (NHEM-NHEK)

Unos co-cultivos de NHEM/NHEK se inocularon en placas de 24 pocillos. Se prepararon tres series de placas idénticas con el fin de evaluar:

- La cantidad de melanina por espectrofotometría.
- La viabilidad celular al final del experimento (ensayo con MTT).
- La cantidad de proteínas.

Después de 24 horas de incubación a 37°C, el medio de cultivo se eliminó y se sustituyó por un medio que contenía o no (control) los péptidos de arroz (a 0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml y 2 mg/ml), o la molécula de referencia propigmentantea (IBMX = isobutylmetilxantina a 200 µM), y después los co-cultivos se incubaron a 37°C durante 10 días.

Un lote de las placas no se irradió (lote de NHEM/NHEK de cocultivo no irradiado).

ES 2 347 836 T3

El segundo lote se irradió durante 4 días consecutivos a una dosis de 25 mJ/cm² de UVB + 300 mJ/cm² de UVA, y después se renovó el medio de cultivo que contenía o no los productos (péptidos de arroz o IBMX), los co-cultivos se cultivaron durante 72 horas sin ninguna irradiación y después se irradiaron nuevamente con 25 mJ/cm² de UVB + 300 mJ/cm² de UVA durante 4 días consecutivos (con un cambio de medio después de 48 h).

Al final del tratamiento, los medios de cultivo se desecharon y la melanina contenida en las células se extrajo mediante una disolución de NaOH 0,5 N, y después se evaluó la cantidad de melanina producida en cada condición de co-cultivo, midiendo la densidad óptica de las muestras a 405 nm contra una escala de melanina exógena.

Viabilidad celular y cantidad de proteínas

Los resultados del ensayo con MTT se presentan en la tabla 2 siguiente:

TABLA 2

Evaluación de la viabilidad celular en los co-cultivos NHEM/NHEK

Muestra	% de viabilidad en los co-cultivos no irradiados	% de viabilidad en los co-cultivos irradiados
Control	100	100
200 µM de IBMX	118	111
0,1 mg/ml de péptidos de arroz	122	112
0,5 mg/ml de péptidos de arroz	131	122
2,0 mg/ml de péptidos de arroz	138	126

Los resultados de la dosificación de proteínas se presentan en la tabla 3 siguiente:

TABLA 3

Dosificaciones de las proteínas en los co-cultivos

Muestra	Proteínas (mg/ml) en los co-cultivos no irradiados	Proteínas (mg/ml) en los cocultivos irradiados
Control	0,828	0,767
200 µM de IBMX	0,933	0,833
0,1 mg/ml de péptidos de arroz	0,864	0,742
0,5 mg/ml de péptidos de arroz	0,890	0,774
2,0 mg/ml de péptidos de arroz	0,942	0,973

Los péptidos de arroz no presentan ninguna toxicidad sobre los co-cultivos de NHEM/NHEK (la misma observación para IBMX). Por el contrario, se observó un aumento de la cantidad de proteínas y de la actividad metabólica de las células en presencia de péptidos de arroz como en IBMX.

Dosificación de la melanina

Los resultados se presentan en la tabla 4 siguiente:

TABLA 4

Modulación de la producción de melanina en los co-cultivos de NHEM/NHEK

Muestra	% de aumento de la cantidad de melanina con relación al control en los co-cultivos no irradiados	% de aumento de la cantidad de melanina con relación al control en co-cultivos irradiados
200 μ M de IBMX	+18%*	+14%*
0,1 mg/ml de péptidos de arroz	+15%*	+7%\$
0,5 mg/ml de péptidos de arroz	+12%*	+5%
2,0 mg/ml de péptidos de arroz	+29%*	+11%*

* Estadísticamente diferente del control ($p < 0,01$, ensayo de Dunnett)

\$ Estadísticamente diferente del control ($p < 0,05$; ensayo de Dunnett)

En las condiciones no irradiadas, los péptidos de arroz ensayados a 0,1, 0,5 y 2,0 mg/ml, aumentaron significativamente la cantidad de melanina (+15%, +12% y +29%, respectivamente, con relación al control; $p < 0,01$).

En las condiciones irradiadas, los péptidos de arroz ensayados a 2 mg/ml aumentaron significativamente la cantidad de melanina (+11% con relación al control; $p < 0,01$). A 0,5 mg/ml y 0,1 mg/ml, esta estimulación fue menos notable.

Los péptidos de arroz actúan sobre la síntesis de melanina de la misma manera que la molécula de referencia propigmentantea (IBMX).

Además, tal como para IBMX, la estimulación de la síntesis de melanina por los péptidos de arroz se correlaciona con un aumento de la cantidad de proteínas y de la actividad metabólica de las células (% de viabilidad) (véanse las tablas 2 y 3).

Ejemplo 3

Efectos sobre la actividad de la tirosinasa en unos cultivos de melanocitos (NHEM)

Los melanocitos (NHEM) se cultivaron previamente en placas de 96 pocillos durante 24 horas, y después las células se trataron mediante los péptidos de arroz o IBMX (200 μ M) durante 72 horas a 37°C.

Al final del tratamiento, la tirosinasa contenida en las células se extrajo y la reacción de oxidación de L-DOPA en DOPA-quinona se monitorizó durante 1 hora a 37°C después de añadir L-DOPA (substrato de reacción). Después se evaluó la actividad de tirosinasa midiendo la densidad óptica de las muestras a 450 nm contra una escala estándar de tirosinasa.

Los resultados se presentan en la tabla 5 siguiente:

TABLA 5

Efectos de los tratamientos sobre la actividad de tirosinasa de melanocitos humanos

Muestra	Actividad de tirosinasa (unidad/ml)	% de aumento en relación con el control
Control	29,12	-
200 μ M de IBMX	60,88*	+109%
0,5 mg/ml de péptidos de arroz	46,29*	+59%
2,0 mg/ml de péptidos de arroz	79,18*	+172%

* Estadísticamente diferente del control ($p < 0,01$, ensayo de Dunnett).

ES 2 347 836 T3

Los péptidos de arroz ensayados a 0,5 mg/ml y 2 mg/ml, estimularon significativamente la actividad de tirosinasa de los melanocitos humanos, según un efecto dependiente de la dosis (+59% y +172%, respectivamente, con relación al control, $p < 0,01$).

Ejemplo 4

Evaluación de la dendricidad de los melanocitos en co-cultivo con queratinocitos (NHEM/NHEK)

Los co-cultivos de NHEM/NHEK se inocularon 24 horas antes del ensayo en placas de 96 pocillos y después se incubaron durante 72 horas en presencia o no (control) de péptidos de arroz (a 0,1, 0,5 y 2,0 mg/ml), o de IBMX (a 200 μ M).

La dendricidad se observó por una señalización fluorescente con la ayuda de un anticuerpo específico de los melanosomas anti-MEL5 (o TRP1- Tyrosinase Related Protein 1). La señalización fue revelada por un anticuerpo secundario, GAM-FITC.

Este análisis permitió determinar la densidad de las extensiones de los melanocitos (número y longitud total de dendritas por melanocito).

Efecto sobre la dendricidad de los melanocitos en co-cultivo con unos queratinocitos

TABLA 6

Medición de la dendricidad de los melanocitos en co-cultivo NHEM-NHEK: Análisis del número de dendritas por melanocito

Tratamiento	Número medio de dendritas por melanocito	% de aumento con relación al control
Control	12,18	-
200 μ M de IBMX	15,30*	+26%
0,1 mg/ml de péptidos de arroz	12,73	+4%
0,5 mg/ml de péptidos de arroz	14,52*	+19%
2,0 mg/ml de péptidos de arroz	15,43*	+27%

* Estadísticamente diferente del control ($p < 0,01$, ensayo de Dunnett)

TABLA 7

Medición de la dendricidad de los melanocitos en co-cultivo NHEM/NHEK: Análisis de la longitud de las dendritas

Tratamiento	Longitud media de dendrita por melanocito	% de aumento con relación al control
Control	228,18	-
200 μ M de IBMX	402,50 \$	+76%
0,1 mg/ml de péptidos de arroz	276,09	+21%
0,5 mg/ml de péptidos de arroz	285,20	+25%
2,0 mg/ml de péptidos de arroz	381,82*	+67%

\$ Estadísticamente diferente del control ($p < 0,01$, \$ $p < 0,05$, ensayo de Dunnett)

Los péptidos de arroz ensayados a 2 mg/ml y 0,5 mg/ml aumentaron de manera dependiente de la dosis, el número y la longitud de las extensiones de los melanocitos. A 0,1 mg/ml el efecto sobre el número de dendritas no es visible, aunque se observa todavía un efecto menor sobre la longitud.

Ejemplo 5

*Efecto sobre la transferencia de melanosomas de los melanocitos a los queratinocitos cercanos**Protocolo*

Antes de la inoculación, los melanocitos se “cargaron” con la sonda trazadora fluorescente de la transferencia de melanosomas “succinimidyl ester of carboxy fluorescein diacetate” (CFDA: diacetato de carboxifluoresceína, éster succinimidilo).

Los melanocitos “cargados” se incubaron entonces en co-cultivo con los queratinocitos a 37°C (NHEM/NHEK). Se realizaron varios controles con el fin de proceder a los ajustes de los parámetros de adquisición por citometría de flujo:

- Co-cultivo de NHEM/NHEK “no cargado”.
- Cultivos de NHEK solos.
- Cultivos de NHEM “cargados” o “no cargados” ensayados solos.

A 60%-80% de confluencia, el medio de cultivo se reemplazó por un medio que contenía o no (control) los péptidos de arroz (0,5 y 2 mg/ml) o IBMX, y después las células se cultivaron a 37°C. Después de 72 h de incubación, las células se volvieron a tratar como antes y después se incubaron nuevamente durante 72 h a 37°C. Cada condición de tratamiento se realizó por triplicado.

Al final del tratamiento, las células se sometieron a tripsinación, se fijaron, se permeabilizaron y después se seña-
lizaron con un anticuerpo anti-citoqueratinas (específico de los queratinocitos). La señalización se reveló con la
ayuda de un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo anti-citoqueratina y acoplado con ficoeritrina. Los
parámetros de fluorescencia se midieron mediante citometría de flujo.

Análisis de los resultados por citometría de flujo

El análisis citométrico se parametrizó (gracias a los diversos controles realizados) con el fin de seleccionar en la población celular total (NHEM/NHEK) únicamente los queratinocitos positivos; es decir, que han incorporado la sonda fluorescente CFDA (indicando la transferencia de los melanosomas), y que presentan una señalización anti-citoqueratinas (específica de queratinocitos). Esta población de queratinocitos “señalados doblemente” es obligatoriamente el resultado de una transferencia de melanosomas del melanocito a los queratinocitos.

Resultados y conclusiones

Los resultados se presentan en la tabla 8 siguiente:

TABLA 8

Efecto de los tratamientos sobre la transferencia de melanosomas de los melanocitos a los queratinocitos

Muestra	% medio de células positivas (doble marcaje CFDA/citoqueratinas)	% de aumento con relación al control
Control	18,1	-
200 µM de IBMX	26,7*	+48%
0,5 mg/ml de péptidos de arroz	23,3*	+29%
2 mg/ml de péptidos de arroz	23,1*	+28%

\$ Estadísticamente diferente del control (p<0,01, \$ p<0,05, ensayo de Dunnett)

Los péptidos de arroz ensayados a 0,5 mg/ml y 2 mg/ml indujeron un aumento significativo de la transferencia de melanosomas (29% y 28% respectivamente, con relación al control). Los péptidos de arroz presentan por lo tanto un efecto estimulador sobre la transferencia de melanosomas.

Ejemplo 6

Efecto sobre la pigmentación de piel viva

5 Unas muestras de piel obtenidas a partir de una biopsia mamaria se trataron por aplicación tópica de péptidos de arroz (a 0,1, 0,5 y 2,0 mg/ml), o IBMX (a 200 μ M) (aplicación de 20 μ l, es decir, aproximadamente 5 mg/cm²). Los explantes se mantuvieron entonces durante 144 horas a 37°C.

10 Las áreas tratadas y de control se fotografiaron al final del tratamiento y la coloración de la piel se analizó visualmente.

La IBMX aumentó ligeramente la pigmentación de la piel después de 144 horas de cultivo.

15 Los péptidos de arroz aumentaron la pigmentación de la piel de manera dependiente de la dosis después de 144 h de cultivo. El agente activo presenta un efecto propigmentación de acuerdo con los resultados obtenidos en los otros ensayos realizados.

Conclusión de los ejemplos 2 a 6

20 Los ejemplos mencionados anteriormente han permitido demostrar un efecto propigmentante de los péptidos de arroz. En efecto, se ha demostrado que los péptidos de arroz aumentan la síntesis de melanina en co-cultivos de NHEM/NHEK irradiados o no; aumentan la actividad de tirosinasa (enzima clave en la melanogénesis); aumentan el número y la longitud de las extensiones de los melanocitos; aumentan la transferencia de los melanosomas de los melanocitos a los queratinocitos, y aumentan la pigmentación de los explantes de piel.

Además, la actividad de los péptidos de arroz en los diversos estudios realizados es comparable a la actividad de IBMX, usada en este caso como una molécula propigmentante de referencia.

30 El agente activo a base de péptidos de arroz es por lo tanto un acelerador del bronceado. En efecto, con o sin exposición a los UV, induce una estimulación fuerte de la pigmentación cutánea.

Ejemplo 7

35 *Efecto sobre la síntesis de glutatión (GSH) mediante unos fibroblastos cutáneos humanos irradiados con los UVA*

40 Los fibroblastos dérmicos se inocularon en cajas Petri de 60 mm de diámetro. Las células se trataron previamente durante 18 horas con 5 mM de péptidos de arroz o N-acetil-cisteína (NAC = molécula antioxidante de referencia), y después se irradiaron a una dosis de 15 J/cm² de UVA. Después de la irradiación, los fibroblastos se incubaron durante 3 h suplementarias a 37°C.

Al final del tratamiento se recogieron dos series de muestras para evaluar:

- 45 a. La cantidad total de proteínas según el método de Lowry.
b. El índice de glutatión intracelular por dosificación (kit comercial).

Los resultados se exponen en la tabla 9 siguiente:

50

TABLA 9

Modulación del glutatión intracelular de fibroblastos dérmicos irradiados con UVA

55

60

65

	GSH (μ M)	Proteínas totales (g/l)	GSH (μ mol/g proteínas)	% de aumento/células de control irradiadas
Células de control	18,30	0,764	23,95	--
Células de control + UVA 15 J/cm ²	15,50	0,708	21,89	-8,60% contra células de control
NAC (5 mM)	21,10	0,748	28,209	29
Péptidos de arroz 0,5% MS	17,70	0,718	24,65	13
Péptidos de arroz 1% MS	18,70	0,714	26,19	20
Péptidos de arroz 1,5% MS	21,20	0,753	28,15	29

ES 2 347 836 T3

Una irradiación a una dosis de 15 J/cm² redujo casi en 9% el índice de GSH intracelular de los fibroblastos con relación a las células no irradiadas.

La NAC, a una dosis de 5 mM, aumenta en 29% el contenido en GSH de las células irradiadas.

Los péptidos de arroz, a las concentraciones de 0,5-1 y 1,5% MS, aumentan en 13, 20 y 29%, respectivamente, el contenido de GSH de los fibroblastos sometidos a un estrés por UVA.

En otras palabras, los péptidos de arroz son capaces de compensar la disminución de los índices intracelulares de GSH después de una irradiación UVA.

Conclusión general

Los péptidos de arroz permiten estimular el bronceado protegiendo al mismo tiempo la piel de los efectos nocivos del Sol.

Ejemplo 8

Formulaciones

8a - Crema facial

	%
Isononanoato de isononilo	6,000
Malato de di-alquilo (C ₁₂₋₁₃)	3,000
Estearato de isocetilo	4,000
Butilenglicol	1,000
Péptidos de arroz	3,000
Eter de dicaprililo	5,000
Salicilato de silanodiol	1,000
Alcohol araquidílico	1,650
Trometamina	1,180
Alcohol cetílico	0,5
Ácido salicílico	1,000
Glucósido de ascorbilo	1,000
Glicina	1,000
Acetato de tocoferilo	1,000
Alcohol behenílico	0,900
Escualano	0,790
Citrato de sodio	0,660
Copolímero PPG-12/SMDI	0,100
Glucósido araquidílico	0,350
Perfume	0,400
Goma de Sclerotium	0,300
Alcohol cetearílico	0,430
Acido cítrico	0,110
Sepigel 305*	0,100
Sistema conservante	c.s.
Agua	c.s.p. 100
* producto comercializado por la compañía Seppic	

ES 2 347 836 T3

8b - *Producto cosmético bronceador y antienvjecimiento para el Sol (Cantidad: 100 g)*

	%
5	Agua 64,83
	Péptidos de arroz 7
	Insaponificable de aguacate furánico 2
	Butilenglicol 3
10	Alcohol cetílico 6
	Lactato de alquilo C12-13 2
	Aceite mineral 7
	Ceteth 20 2
15	Acido esteárico 1
	Cinamato 5
	Mexoryl SX 3
	Mexoryl XL 4
20	Dióxido de titanio ultrafino 7
	Óxido de zinc 2
	Tinosorb M y S 4
	Acetato de tocoferol 0,50
25	Propilenglicol 0,56
	EDTA disódico 0,52
	Trietanolamina 0,80
	Conservante 0,30
30	Ácido cítrico 0,25
	Metilparabeno 0,11
	Steareth -20 1
	Metabisulfito de sodio 0,05
35	Sulfito de sodio 0,05
	Propilparabeno 0,03

40 8c - *Roll-on anti-manchas blancas (cantidad: 100 g)*

	%
45	Vaselina 6,00
	Aceite hidrogenado de palma 4,00
	Caprilo caprato de glicerol 2,00
	Éster de sacarosa 7 (diestearato de sacarosa) 6,00
50	Escualano 1,00
	Cera de candelilla 2,00
	Éster de sacarosa 11 (estearato de sacarosa) 0,50
	Péptidos de arroz 2,00
55	Concentrado de girasol 2,00
	Glicerol 5,00
	Glucodextrina 1,00
	Trometamina 0,01
60	Goma de xantano 0,20
	Hidroximetilglicinato A 0,60
	Ácido cítrico 0,32
	Ciclometiconol 5,00
65	Ceramida/Colesterol 0,60
	Agua purificada 5,00

ES 2 347 836 T3

8d - Crema para el mantenimiento del bronceado (cantidad: 100 g)

	%
5	Escualeno
	1,00
	Ester de eritritilo
	4,00
	Pentanoato de decilo
	4,00
	Glucósido de cetearilo
	2,00
10	Éter laurílico 23 OE
	1,00
	Cutina CBSV
	1,00
	Cera de abejas
	0,50
	Miristato de miristilo
	1,00
15	Conservante
	0,30
	Vaselina espesa
	5,00
	Escualano gelificado
	3,00
	Péptidos de arroz
	5,00
20	Agua purificada
	56,51
	Fenoxietanol
	0,80
	EDTA disódico
	0,10
	Acido cítrico
	0,14
25	Sorbato de potasio
	0,45
	Glicerina
	5,00
	Espesante
	0,50
	Lejía de sosa
	0,30
30	Gel de poliacrilamida 6°C
	1,00
	Acetato de vitamina E 35°
	0,50
	Perfume
	0,50
	Péptido de altramuz
	1,00
35	Ciclometiconol
	7,00
	Sílice TiO ₂
	1,00
	Genisteína al 85%
	0,10
	PEG 300
	0,90
40	

8e - Crema bronceadora para vitiligo y las hipopigmentaciones (cantidad: 100 g)

	%
45	Montanov 68
	3
	Amphisol K
	0,50
	Miglyol 812
	6
50	Conservante
	0,30
	Manteca de karité
	1
	Péptidos de arroz
	1
	Polifenol
	0,5
55	DHA
	2
	EDTA Na ₂
	0,10
	Acido cítrico
	0,01
	Conservante
	0,40
60	Butilenglicol
	1
	Agente gelificante
	0,25
	Lejía de sosa
	0,4
	Gluconato de manganeso
	0,05
65	Sal de zinc
	0,10
	Agua purificada
	c.s.p.

ES 2 347 836 T3

8f - Cápsula blanda nutracéutica capilar de autobronceado y fortificante

		%
5	Cisteína o derivados de aminoácidos azufrados	0,100
	Péptidos de arroz	500
	Vitamina del grupo B	1
	Hidrolizados de guisante	50
10	Hidrolizados de pluma de pato	50
	Excipiente	c.s.

15 8g - Tratamiento de las hipopigmentaciones por vía oral

		%
	Mucilago (alginato de sodio)	500 mg
20	Aceite de pescado	500 mg
	Péptidos de arroz	100 mg
	Sal de zinc	1 mg
	Extracto de zanahoria	325 mg
25	Licopeno	50 mg
	Excipiente de cápsula blanda	c.s.

30 8h - Crema en gel antienvjecimiento y bronceadora sin Sol (cantidad: 100 g)

		%
	Carbopol Etd 2020	0,6
35	Goma de xantano	0,15
	Genisteína al 85%	0,1
	Retinol	0,5
	NaOH	0,001
40	Conservante	0,9
	Péptidos de arroz	2
	Glucodextrina	2
	Perfume	0,7
45	Silicona	0,3
	Agua purificada	c.s.p.

50 8i - Toallitas pigmentantes (cantidad: 100 q)

		%
	Poloxamer 184	1,0000
55	Perfume	0,2000
	Agua purificada	91,1550
	PEG-32	4,0000
	Conservador	1,0000
60	Clorhexidina	0,1500
	Fenoxietanol	0,1000
	Alantoína	0,2000
	Péptidos de arroz	5,0000
65	Solubilizante	1,0000
	Trometamina	0,1950

ES 2 347 836 T3

8j - *Disolución hidro-glico-alcohólica para el crecimiento y la coloración del cabello*

		%
5	Alcohol desnaturalizado	70%
	Ciclodextrina	2%
	Glicol	25%
	Aminexil	1%
10	Minoxidil	0,3%
	Agua	c.s.p. 100%

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso no terapéutico de un hidrolizado de proteínas de arroz para pigmentar, hiperpigmentar o repigmentar la piel y los faneros.

2. Uso según la reivindicación 1, para unas aplicaciones seleccionadas de entre el grupo constituido por el aumento y la intensificación de la pigmentación normal de la piel sin Sol, la aceleración y la intensificación del bronceado y la prevención del fotoenvejecimiento.

3. Uso según la reivindicación 1, destinado a repigmentar las manchas blancas cutáneas, en particular las manchas que resultan de una afección o de una sensibilización seleccionada de entre el grupo constituido por vitiligo, pitiriasis, el uso de dermo-corticoides, cicatriz, o exposición solar intensa.

4. Uso según la reivindicación 1, destinado al cuidado capilar para prevenir y tratar los cabellos blancos.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el hidrolizado de proteínas de arroz comprende unos péptidos, de los cuales por lo menos el 50% tienen un peso molecular comprendido entre 300 Da y 10.000 Da, más particularmente entre 300 Da y 3.500 Da.

6. Uso según la reivindicación 5, **caracterizado** porque por lo menos 50% de los péptidos tienen una masa molecular comprendida entre 300 Da y 1.200 Da.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el hidrolizado de proteínas de arroz está presente en una composición en concentración comprendida entre 0,1 y 20% en peso, con relación al peso total de la composición.

8. Uso según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque la composición comprende además unos agentes antioxidantes, fotoprotectores, hidratantes, colorantes, hiperpigmentantes, o anti-edad.

9. Método de tratamiento cosmético no terapéutico para estimular la pigmentación constitutiva o adquirida, **caracterizado** porque se aplica por vía tópica una composición que comprende por lo menos un hidrolizado de proteínas de arroz.

10. Método de tratamiento cosmético según la reivindicación 9, destinado a a acelerar el bronceado y el color natural de la piel sin Sol.